



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Demostración del potencial patógeno de la larva 3
morfotipo II de *Anisakis* spp. aislada de *Sarda
chiliensis chiliensis* tratada con especias empleadas en
la preparación del ceviche peruano, en modelo murino**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga**

AUTOR

Araceli Yennifer RODRIGUEZ MUÑOZ

ASESOR

Mg. Rosa Nériida MARTÍNEZ ROJAS

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodriguez, A. (2021). *Demostración del potencial patógeno de la larva 3 morfotipo II de Anisakis spp. aislada de Sarda chiliensis chiliensis tratada con especias empleadas en la preparación del ceviche peruano, en modelo murino*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	“_”
DNI del autor	77243369
Código ORCID del asesor (es)	https://orcid.org/0000-0002-5100-0452
DNI del asesor	08426698
Grupo de investigación	Biología Molecular de parásitos y de recursos pesqueros (BIMPARPE)
Financiamiento	Perú, UNMSM, PTGRADO, B19100394
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	En las sedes de la UNMSM en Lima 12°03'30"S 77°05'00"O
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
Disciplinas OCDE	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 10:15 horas del 16 de abril de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/evd-rjwc-zay>, el jurado formado por los profesores que suscriben, dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **ARACELI YENNIFER RODRIGUEZ MUÑOZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200042230, la titulando expuso su tesis: **“DEMOSTRACIÓN DEL POTENCIAL PATÓGENO DE LA LARVA 3 MORFOTIPO II DE *Anisakis* spp. AISLADA DE *Sarda chiliensis chiliensis* TRATADA CON ESPECIAS EMPLEADAS EN LA PREPARACIÓN DEL CEVICHE PERUANO, EN MODELO MURINO”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: **APROBADO CON MÁXIMOS HONORES**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **ARACELI YENNIFER RODRÍGUEZ MUÑOZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:55 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 16 de abril de 2021.

Dr. JUAN ATILIO JIMÉNEZ CHUNGA
(PRESIDENTE)

Mg. ROSA NERIDA MARTÍNEZ ROJAS
(ASESORA)

Mg. DÉBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE
(MIEMBRO)

Mg. NORA VERA OBANDO
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a aquellas personas que permitieron que sea posible esta investigación y que sin su ayuda no hubiera sido posible su culminación de este. Desde la persona que me vendió los peces en el terminal hasta el Instituto del Mar del Perú. A mi asesora por permitirme formar parte del grupo de investigación y enseñarme todos sus conocimientos que me permitieron descubrir nuevas pasiones. A mi familia en general por darme la educación y la paciencia.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas, por ello, expreso mi gratitud a mi asesora Mg. Rosa Nérida Martínez Rojas, responsable de Laboratorio Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis, FCB, UNMSM, por el gran apoyo para la culminación de presente proyecto.

A la Doctora Carmen Rosario Yamashiro Guinoza, Directora General de la Dirección General de Investigaciones de los Recursos Demersales y Litorales del Instituto del Mar del Perú, por proporcionarme los peces y posibilitar el muestreo en sus ambientes.

Al laboratorio de Patobiología acuática del IMARPE por permitirme realizar el procesamiento histológico en sus instalaciones.

A los miembros del Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis: Daniel Espejo, Fredy Egusquiza, Karen Barboza y Tatiana Ancajima por el apoyo y paciencia en el muestreo.

A mi ex jefa de trabajo: Rita Orozco, por su paciencia y apoyo.

A mis compañeros de trabajo: Elmer Medina, Flores Castillo, Oscar Espinoza por su apoyo perenne.

A todos, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Patología	3
2.2. Ciclo biológico	4
2.3. Hospedadores paraténicos de la larva L ₃ morfotipo II de <i>Anisakis</i> sp.	5
2.4. Detalles pesqueros	5
2.4.1. Distribución y desembarque	5
2.4.2. Temporada de captura	6
2.5. Antecedentes	6
III. HIPÓTESIS	8
IV. OBJETIVOS	9
4.1. OBJETIVO GENERAL	9
V. MATERIAL Y MÉTODOS	10
VI. RESULTADOS	14
6.1. PREVALENCIA E INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA EN EL HOSPEDERO	14
6.2. DEMOSTRACIÓN DE LOS EFECTOS PATOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN CON LARVAS 3 MORFOTIPO II DE <i>Anisakis</i> spp., TRATADAS EN DISTINTAS MEZCLAS DE ESPECIAS (<i>C. pubescens</i> , <i>C. limón</i> , <i>A. sativum</i> y <i>P. nigrum</i>) DURANTE 1 Y 3H, EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL MODELO MURINO	15
6.3. DETERMINACION DEL EFECTO POSIBLE DE LOS FACTORES DE TRATAMIENTO Y TIEMPO SOBRE EL NÚMERO DE LARVAS 3 MORFOTIPO II DE <i>Anisakis</i> SPP. CON POTENCIAL PATÓGENO RESPECTO AL NÚMERO DE LARVAS INOCULADAS.	68
VII. DISCUSIÓN	71
VIII. CONCLUSIONES	75
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
X. ANEXOS	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	A-C Larvas pretratadas con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 1h encontradas en la cavidad abdominal. (A) Pseudoquiste inmerso en grasa abdominal. (B) Larva incrustada en omento mayor. (C) Larva incrustada en mesenterio.	16
Figura 2.	Larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 1h en la superficie del hígado	17
Figura 3.	A-C Lesiones en el intestino delgado de ratas infectadas con larvas pretratadas con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 1h. (A-B) Hemorragias en el íleon y duodeno. (C) Larva penetrando la mucosa intestinal.	18
Figura 4.	Rotura de vasos sanguíneos en la curvatura mayor del estómago de larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 1h	19
Figura 5.	Larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 3h libre en la cavidad	20
Figura 6.	Nódulo en la superficie intestinal de la rata infectada con larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 3h.	21
Figura 7.	Nódulo en el fundus del estómago de rata infectada con larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 3h.	21
Figura 8.	Lesión en el hígado de rata infectada con larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 1h (aumento x10).	22
Figura 9.	Corte transversal del intestino de rata infectada con larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 3h, se observa la capa muscular (Ms) y la serosa (se) afectadas. Submucosa (S), Mucosa (M).	23
Figura 10.	Corte transversal del parásito (P) pretratado con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> - 3h rodeada de reacción inflamatoria (Rxn).	24
Figura 11.	Exudado eosinofílico de reacción inflamatoria anterior causada por larva pretratada con <i>C. pubescens</i> y <i>C. limon</i> .	24
Figura 12.	A-C Larvas pretratadas con <i>C. limon</i> -1h en la cavidad abdominal. (A) Incrustada en el mesenterio. (B) En el omento mayor. (C) En la grasa abdominal.	25
Figura 13.	Larva pretratada con <i>C. limon</i> -1h introduciéndose al músculo abdominal de la rata.	26

Figura 14.	A-B Efectos de la infección de larvas pretratadas con <i>C. limón</i> -1h en el intestino. (A) Pseudoquiste en la superficie intestinal. (B) Agujero en el intestino rodeado de una pequeña mancha hemorrágica.	27
Figura 15.	Larva pretratada con <i>C. limon</i> -3h incrustada en el mesenterio.	28
Figura 16.	Nódulo en la superficie del hígado de rata infectadas con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> -3h.	29
Figura 17.	Larva pretratada con <i>C. limon</i> - 3h impregnada al músculo	29
Figura 18.	Hemorragia en parte glandular del estómago de rata infectada con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> -3h.	30
Figura 19.	Pseudoquiste (Q) en la superficie del hígado (H) de rata infectadas con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> – 3h	31
Figura 20.	Exudado eosinofílico de lesión anterior en mayor aumento (aumento x40) causado por larva pretratada con <i>C. limon</i> .	32
Figura 21.	Hallazgos encontrados en el hígado de rata infectadas con larva pretratadas con <i>C. limon</i> -3h A. Necrosis de los hepatocitos, se muestra el núcleo picnótico. B. Degeneración de la grasa.	33
Figura 22.	Hemorragia difusa y superficie capsular del hígado de rata infectada con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> – 3h.	34
Figura 23.	Miositis de tipo eosinofílica focal de curso agudo parasitario. Migración de la larva pretratada con <i>C. limon</i> -1h a través de las fibras musculares originando una reacción inflamatoria inicial.	36
Figura 24.	Miositis de tipo supurativa fibrinoide multifocal parasitaria en tejido junto a la larva pretratada con <i>C. limon</i> - 1h.	37
Figura 25.	Necrosis coagulativa. Lesión anterior en mayor aumento (magnificación x 40) se muestra los neutrófilos (N), eosinófilos (Eo) y fibrina (F) entre miofibrillas musculares (Mio).	37

Figura 26.	Corte del intestino con parte del pseudoquiste (Q) de rata infectada con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> -1h se observa alteración de la mucosa (M) y capa muscular (Ms). Submucosa (s) y Serosa (se).	38
Figura 27.	Parte del pseudoquiste unida a la capa muscular del intestino. Se muestra corte transversal de la larva a nivel del intestino (i) donde es visible los cordones hipodermales bilobulados (Chl) así como también la musculatura somática (Mso) y la cutícula (c).	38
Figura 28.	Exudado eosinofílico de reacción inflamatoria anterior de rata infectada con larvas pretratadas con <i>C. limon</i> - 1h (Medida= 10um).	39
Figura 29.	Larva pretratada con <i>C. limon</i> -3h rodeada de reacción inflamatoria (Rx) perforando la capa muscular (Ms) y serosa (se) del estómago.	40
Figura 30.	Atrofia de la capa muscular del estómago de rata infectada con larvas con <i>C. limón</i> - 3h. Capa submucosa (s), vellosidades intestinales (v), capa muscular (Ms), capa mucosa (M) y capa serosa (Se).	41
Figura 31.	Nódulos formados por las larvas pretratadas con <i>A.sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -1h. (A) En el mesenterio y (B) En la grasa abdominal.	42
Figura 32.	Nódulo en la superficie intestinal de rata infectada con larvas pretratadas con <i>A.sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -1h.	43
Figura 33.	Larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -1h incrustada en el tejido muscular	43
Figura 34.	Larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h en el mesenterio	44
Figura 35.	A-B Efectos de las larvas pretratadas con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h en el intestino. (A) Nódulo en la superficie del intestino delgado. (B) Incrustada en el intestino grueso.	45
Figura 36.	Larva pretratada con pretratadas con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h en el tejido muscular.	46

Figura 37.	Corte transversal de la larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> - 3h inmersa en el tejido muscular donde se observa el ventrículo (v), la célula excretora (CE), cordones hipodérmicos bilobulados (Chl), musculatura somática (Mso) y cutícula (C) rodeado de Rxn inflamatoria. Miofibrillas (Mio).	47
Figura 38.	Corte de lesión anterior a mayor aumento (magnificación x 40), se observa hemorragia, edema entre miofibrillas (Mio) y necrosis focal coagulativa (NI).	48
Figura 39.	Corte transversal del quiste embebido en el mesenterio que rodea al intestino de la rata infectada con larvas pretratadas con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h. Nótese elementos circulares que corresponden al parásito rodeado de de severa reacción inflamatoria. Mucosa (M), vellosidades intestinales (ve), submucosa (s), capa muscular (Ms), serosa (Se) y mesenterio (Me)	50
Figura 40.	Exudado tipo eosinofílico, basofílico y neutrofílico de lesión anterior.	51
Figura 41.	Tendencia a formación granulomatosa rodeando la reacción inflamatoria (Ex) contigua al parásito pretratado con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h. Músculo somático (Mso), Cordones hipodérmicos (Chl), cutícula (c).	51
Figura 42.	Necrosis licuefactiva (NI) bacteriana contiguo al parásito. Cordones hipodérmicos laterales (Chl). Ventrículo (v). músculo somático (Mso).	52
Figura 43.	Cúmulos de bacterias Gram positivas en exudado necrótico de lesión anterior (aumento x 100).	53
Figura 44.	Afectación en vellosidad intestinal de rata infectada con larvas pretratadas con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h. Se observa la infiltración eosinofílica (Eo) en lámina propia y la necrosis de los núcleos de los enterocitos (NI).	53
Figura 45.	Atrofia y desprendimiento de epitelio (EP) de la mucosa del intestino de rata infectada con larvas pretratadas con <i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i> -3h. Lámina propia (Lp).	54
Figura 46.	Corte transversal del pseudoquiste constituido por exudado inflamatorio (Ei), necrótico (En) y larvas.	55
Figura 47.	Exudado necrótico licuefactiva a mayor aumento.	56

Figura 48.	Tendencia a formación granulomatosa de pseudoquiste formado por larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limón</i> y <i>P. nigrum</i> - 1h.	56
Figura 48.	Tendencia a formación granulomatosa de pseudoquiste formado por larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limón</i> y <i>P. nigrum</i> - 1h.	56
Figura 49.	Inflamación severa causado por larva pretratada con <i>A. sativum</i> , <i>C. limón</i> y <i>P. nigrum</i> - 1h a mayor aumento x 40.	57
Figura 50.	A-B Larvas no pretratada encontradas en la cavidad abdominal. (A) Incrustada en mesenterio (B) Nódulo en el omento mayor.	58
Figura 51.	Lado luminal del estómago de la rata mostrando a la larva no pretratada anclada.	59
Figura 52.	Incrustaciones en el intestino grueso de larvas no pretratadas.	60
Figura 53.	Incrustación al músculo de larva no pretratada.	60
Figura 54.	Perforación de la capa muscular (Ms) del estómago de rata infectada con larvas control. Esófago (Es), mucosa (M).	61
Figura 55.	Corte transversal de la larva no pretratada a nivel del esófago paraventricular (Ep) invadiendo la submucosa (s). Se observa la musculatura polimiarica del cuerpo (Mso), los cordones hipodermales bilobulados (Chl) rodeada de inflamación.	62
Figura 56.	A- B Inflamación moderada rodeando al parásito sin pretratar A. Glóbulos rojos signo de hemorragia. B. Células eosinofílicas (Eo) y neutrofílicas (N) en la submucosa (magnificación x 40).	63
Figura 57.	Invasión de eosinófilos (Eo) en lámina propia (LP) de las vellosidades intestinales de la mucosa de rata infectada con larvas control.	64
Figura 58.	Desplazamiento de la larva control a través de los paquetes musculares causando necrosis coagulativa e inflamación eosinofílica (Rx).	65
Figura 59.	Larva control rodeada de exudado inflamatorio.	66

RESUMEN

La Anisakiasis es una infección zoonótica de importancia en nuestro país por la costumbre de los pobladores de ingerir pescado marinado en forma de cebiche o tiradito. Se ha descrito que la larva L3 de *Anisakis* spp. tipo I es el principal agente causante de patología en el hombre; sin embargo, el propósito del presente trabajo es demostrar el potencial patógeno de la L3 tipo II de *Anisakis* spp. aislada de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito” tratada con especias empleadas en la preparación del ceviche a diferentes tiempos, utilizando un modelo murino. Se examinaron 787 ejemplares de *S. chiliensis* obteniéndose 492 larvas, las cuales fueron sometidas a un pre tratamiento de acuerdo con un protocolo trazado en dos diferentes tiempos de 1 y 3 h, y en tres mezclas de ingredientes: La primera en *Capsicum pubescens* “rocoto” + *Citrus limon* “limón”, la segunda sólo con *C. limon* y la tercera con *Allium sativum* “ajos” + *Piper nigrum* “pimienta” + *C. limon*. Luego del pre tratamiento las larvas fueron inoculadas a ratas Wistar por vía oral, inoculando al control larvas sin pre tratamiento. Siguiendo el protocolo, se realizó la necropsia después de 48 h, haciendo observaciones macroscópica y microscópica (histología) de las lesiones; así como se determinó el número de larvas encontradas en cada órgano, con la finalidad de evaluar la capacidad patógena de la larva. Así mismo, se estimó con el programa estadístico Minitab 18 la influencia de las especias y el tiempo en el proceso de infección. Se determinó que el 47.5% de los peces examinados se encontraban parasitados con las larvas 3 tipo II de *Anisakis* spp. con una intensidad media de 1.3 larvas/pez. Se demostró que las larvas son capaces de causar lesiones a nivel del aparato gastrointestinal al adherirse a la pared gástrica o intestinal y/ o penetrar hasta la cavidad abdominal y migrar hacia el tejido muscular, mesenterio, hígado, omento mayor y grasa abdominal, esto se observó tanto con las larvas con y sin pretratamiento. A nivel histológico se observaron lesiones de importancia y nuevos hallazgos como la formación temprana granulomatosa, necrosis licuefactiva bacteriana, atrofia. A nivel estadístico se contempló que solo el pretratamiento mas no el tiempo afecta al N° de larvas con potencial patógeno sobre el número total de larvas administradas y finalmente, la Prueba de Tukey demostró que los tres tipos de tratamientos presentan la misma influencia. En conclusión *S. chiliensis chiliensis* presentó una prevalencia superior a la reportada en años anteriores (1997) y predominante en cuanto a la presencia del morfotipo I en peces de nuestra costa. Se demostró que las especias utilizadas en el pre tratamiento generan un efecto estadísticamente significativo sobre el número de larvas con potencial patógeno; sin embargo, las lesiones macroscópicas como microscópicas observadas en el modelo murino son indicio del

potencial patógeno que puede provocar el morfotipo II de *Anisakis* spp.; por lo tanto, es importante no desestimar al morfotipo II como agente potencialmente patógeno para el hombre, ya que estas especies no afectan por completo la viabilidad patógena de la larva.

Palabras clave: *Anisakis* spp tipo II, especies, infección experimental, modelo murino, potencial patógeno.

I. INTRODUCCIÓN

El ceviche es el plato bandera del Perú declarado patrimonio cultural de la nación. Consiste en un preparado a base de pescado semicrudo al que se le agrega condimentos como zumo de limón, ají, ajos, pimienta principalmente; no obstante, estas especias no cocinan totalmente la carne y por esta razón existe el riesgo de poder contraer la anisakiasis, zoonosis causada por la larva 3 de *Anisakis* spp.

El tipo I (*Anisakis simplex* s.s. y *A. pegreffii*) es considerado como el principal agente etiológico de la anisakiasis, mientras que para el tipo II se han reportado pocos casos de infecciones (Arizono *et al.*, 2012; Cabrera y Altamirano, 2004); por esta razón, se le da más énfasis a la patogenicidad del morfotipo I dejando subestimada al tipo II (Romero *et al.*, 2014); sin embargo, se ha evidenciado experimentalmente que este último presenta capacidad patógena como lo ha demostrado Cabrera *et al.* (1997) en nuestro país, quienes corroboraron que el morfotipo II fue capaz de producir lesiones a nivel del estómago en *Canis lupus familiaris* “perro” y fue suficiente inocular una larva para la aparición de esta patología. Así mismo, Romero *et al.* (2014), en España, mostraron que poseen capacidad de adherirse y dañar diferentes tejidos al evaluarlo en un modelo murino.

En el Perú, se han reportado dos casos probables de anisakiasis gástrica causada por el morfotipo II y hace más de una década no se han presentado casos por esta zoonosis debido a la falta de diagnóstico y seguimiento estadístico por parte de los organismos encargados a nivel nacional como la OGE (Organismo General de Epidemiología) del Ministerio de Salud; como ocurre normalmente en otros países subvaloran esta zoonosis parasitaria (Guardone *et al.*, 2018); no obstante, no se debe descartar una probable emergencia ya que en nuestra costa, algunos peces de consumo directo (*Scomber Japonicus* “caballa”, *Trachurus picturatus murphyi* “jurel”, *Coryphaena hippurus* “perico”; etc.) mostraron alta prevalencia de *Anisakis* spp. morfotipo II, que varía entre 1,4 y 58,33% (Cabrera y Altamirano, 2004) predominando sobre el morfotipo I (4% a 8%) y además se ha demostrado la patogenicidad de estas larvas en experimentaciones *in vivo* (Cabrera *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2014).

Últimamente uno de los peces portadores de la larva tipo II es *S. chiliensis chiliensis* “bonito”, pez de amplia distribución, disponibilidad y de mayor desembarque en nuestra costa. Se caracteriza por ser el segundo pescado más rico en omega 3 después de la anchoveta, siendo esta grasa indispensable para un buen funcionamiento cerebral y cardiaco humano. El Ministerio

de Producción (PRODUCE) reveló que según los últimos datos de la Encuesta Nacional de Hogares (ENAHOG) del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) del 2017, el pescado de mayor consumo de las familias peruanas es el bonito, empleado mayormente para la preparación del ceviche.

Las larvas de *Anisakis* spp. son altamente resistentes a los ácidos orgánicos y soluciones salinas como lo demostró Giarratana *et al.* (2010) presentándose como peligro para la salud del consumidor al ingerir pescado crudo o poco cocido.

A nivel mundial no existen estudios sobre la capacidad patógena de la larva L₃ tipo II luego de ser tratadas con especias del ceviche, por esta razón, el objetivo del presente trabajo es demostrar el potencial patógeno de estas larvas, aisladas de *S. chiliensis chiliensis* “bonito”, a través de la infección experimental en un modelo murino, ya que la infección es considerada como una zoonosis emergente de interés socioeconómico y de salud (Cabrera y Altamirano, 2004).

II. MARCO TEÓRICO

La anisakidosis es una zoonosis parasitaria causada por la ingestión accidental de la larva L3 de *Anisakis* spp. que se encuentra en hospederos paraténicos como peces y cefalópodos. El principal causante de los casos de anisakiasis con cuadros patológicos que se ha reportado en Japón y en algunos países europeos como España se debe a *Anisakis* sp. morfotipo I, identificados molecularmente como *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*; sin embargo, sobre el morfotipo II (*A. paggiae*, *A. physeteris* y *A. brevispiculata*) se desconoce el comportamiento patológico ya que se ha reportado muy pocos casos minimizando su capacidad infectiva (Romero *et al.*, 2014).

2.1. Patología

La infección puede provocar cuatro variedades de patologías: anisakiasis gástrica, anisakiasis intestinal, ectópica o extra gastrointestinal (mesenterio, cavidad peritoneal, epiplón, hígado etc.) y alérgica. La primera constituye el mayor porcentaje de casos humanos y es diagnosticada frecuentemente mediante endoscopia (López *et al.*, 2000) ocasionando hiperemia, edema y ulceraciones. Cuando no se realiza la extracción puede cursar un cuadro crónico dando como resultado la formación de granuloma eosinofílico. Se ha verificado, experimentalmente, que *Anisakis* spp. es capaz de incitar la formación de granulomas en el intestino de ratas debido a que liberan un factor quimiotáctico para eosinófilos (Iwasaki y Torisu, 1982).

La anisakiasis intestinal en humanos es muy difícil de diagnosticar, se basa en varios puntos de evaluación, antecedente de consumir pescado, pruebas serológicas (leucocitarias, eosinófilos, IgE), cuadros típicos por tomografía computarizadas (Torrente *et al.*, 2017) y hallazgos histopatológicos diferenciales (Baron *et al.*, 2014). Se ha encontrado que la anisakiasis intestinal puede ocasionar mayores agravamientos como obstrucción intestinal que podría evolucionar a una perforación con consecuencia de peritonitis y neumoperitoneo, como lo ocurrido en España con el caso de una paciente de 60 años que 48 h antes del ingreso al hospital presentó dolor abdominal por haber consumido tortilla de anchoas en aceite y 24 h antes, anchoas en aceite, diagnosticándose una obstrucción intestinal e ileitis a causa de *Anisakis* spp. Debido a que la paciente presento niveles altos de IgE, se le aplico tratamiento conservador; sin embargo, este caso clínico progreso hasta que la paciente presento una taquicardia y bacteriemia por *Enterobacter cloacae* (Torrente *et al.*, 2017).

Otro caso que indica obstrucción intestinal aguda por anisakiasis fue reportado por Shweiki *et al.* (2015), donde relata que un hombre de 64 años en EE. UU, había consumido almejas crudas y presentaba dolor abdominal difuso de 1 a 2 días; debido al dolor intenso que manifestaba se le realizó laparotomía explorativa donde se observó obstrucción completa en el íleon distal (una banda peritoneal adherida a esta zona) que luego en los cortes histológicos de esta porción se pudo identificar secciones transversales de *Anisakis* spp. invadiendo la submucosa rodeada por abundantes eosinófilos que se extendieron por todas las capas de la pared intestinal dando lugar a un eritema mucosal y engrosamiento de la pared.

La anisakiasis ectópica puede llevar a varias complicaciones como tumoraciones crónicas que podrían ocasionar casos de obstrucción intestinal (Pampiglione *et al.*, 2002), también se le asocia con el cáncer ya que se ha visto que los antígenos de las larvas muestran factores mutagénicos y actividad promotora de tumores (Ishikura *et al.*, 1993).

2.2. Ciclo biológico

Los hospederos definitivos son mamíferos marinos, especialmente cetáceos, que eliminan los huevos no embrionados junto con sus heces al mar. El desarrollo embrionario continúa en este medio y la primera muda (L1 – L2) ocurre dentro del huevo. La larva de vida libre (L2) eclosiona y sobrevive durante varias semanas en el agua a cierta temperatura hasta ser ingerida por crustáceos, especialmente eufásidos, donde realiza la segunda muda desarrollándose a larva L₃ que se localiza libre en el hemocel. También se cree que otros crustáceos pequeños (copépodos) pueden transferir la L₂ a eufásidos u otros crustáceos. Luego es ingerida por un pez planctónico, siendo devorado a su vez por un pez carnívoro o calamar, sirviendo como transporte de la L₃. En este último hospedero paraténico la larva atraviesa el intestino y se dirige hacia la superficie visceral o tejido muscular donde permanece enquistada hasta ser ingerido por mamíferos marinos (hospedero definitivo) o accidentalmente por el hombre. (Ishikura *et al.*, 1993) (Anexo 1).

2.3. Hospedadores paraténicos de la larva L₃ morfotipo II de *Anisakis* sp.

En nuestra costa la larva de *Anisakis physeteris* (s.l.) (morfotipo II) parasita a cuatro peces de consumo: *Scomber japonicus* “caballa”, *Trachurus picturatus murphyi*. “jurel”, *S. chilensis* “bonito” y *Coryphaena hippurus* “perico”, y su prevalencia varía entre 1,4 y 58,33%, mucho mayor que las larvas de morfotipo I (Cabrera y Altamirano, 2004).

Sarda chiliensis chiliensis

Pertenece a la familia Scombridae (Orden Perciformes), es una especie pelágica y oceanógrafa, se encuentra cerca de la costa y forma cardúmenes. Es carnívora y se alimenta de anchoveta (*Engraulis ringens*), moluscos y crustáceos pelágicos. Es un pescado azul, entre los más abundantes del mar peruano y rico en Omega 3. Es el de mayor importancia por el gran volumen de su captura, así como por su amplia distribución en nuestra costa. En el Pacífico sur se distribuye desde puerto Pizarro en el Perú hasta Talcahuano, Chile (IMARPE). En los años 2015 al 2017 el término medio de captura anual alcanzó más de 90 mil toneladas, ocho veces más de lo que se desembarca a *T. murphy*, segundo pez de mayor consumo por la población.

2.4. Detalles pesqueros

2.4.1. Distribución y desembarque

Los reportes de áreas de pesca de bonito durante el 2018, obtenidos a través de las examinaciones a bordo del Programa Bitácoras de Pesca(PBP)- IMARPE bajo la Dirección General de Investigación de Recursos Pelágicos (DGIRP) ratificaron la vasta distribución del pez a lo largo del litoral peruano, contando con tres áreas de pesca principales : la primera, en el sur del litoral desde Ático a Morro Sama , la segunda área en la zona central es desde Huarney hasta el sur de Pisco dentro de las 60 millas y la última, en la zona costera norte entre Talara y Pimentel. Siendo en las 2 últimas áreas donde el bonito se distribuyó principalmente, en la zona central desde Chimbote al Callao hasta las 75 millas y en toda el área de la zona norte dentro de las 35 millas (Anexo 2.1)

Los reportes quincenales de la pesca del bonito desde enero hasta mayo del 2019 reafirman la amplia distribución de este pez, pero durante el mes de febrero y abril se observa mayor distribución a lo largo de todo el litoral (Anexo 2.2).

En el 2018 se estableció una cuota de captura de 63 800 toneladas de bonito para todo el litoral peruano (R.M. 187-015-PRODUCE); sin embargo, se sobrepasó el límite capturándose más de 65 mil toneladas. El límite de captura desde enero hasta diciembre del 2019 fue de 64 mil toneladas; hasta el momento, según reportes de actividad pesquera del bonito brindados por el Área Funcional De Investigación De Recursos Transzonales Y Altamente Migratorios (AFIRTAM) – IMARPE, desde inicios de año hasta el 20 de junio se ha desembarcado 27 661 toneladas, el 43.22 % del límite total de captura por año (Anexo 3).

2.4.2. Temporada de captura

Su disponibilidad es mayor en la primera y verano mientras que se reduce en el otoño e invierno, según indica la información de desembarques de bonito del 2011 al 2017 brindados por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE); sin embargo, debido a los últimos cambios climáticos con respecto al ambiente se incrementó su disponibilidad. Durante el 2018 se ha comportado según su estacionalidad, menguando a partir de abril e intensificándose a partir de octubre.

2.5. Antecedentes

El principal agente causal de los casos reportados de anisakiasis ha sido el morfotipo I en especial *Anisakis simplex*. Sin embargo, se han reportado pocos casos por el morfotipo II, particularmente *A. physeteris*. Asato *et al.* (1991) describieron el caso de un hombre de 47 años residente de Okinawa, Japón que había consumido pescado y calamar crudo en vinagre y “miso”, dos días después comenzó a tener náuseas y dolor fuerte en el estómago. La endoscopia reveló la presencia de larvas de tercera etapa de *A. physeteris* y Kagei *et al.* (1978) mencionaron otro caso de infección por este morfotipo en un niño de 14 años en la prefectura de Shizuoka, Japón, que presentó dolor abdominal después de consumir “sushi” preparado con calamar crudo (*Todarodes pacificus*) y “sashimi” preparado de pescado crudo (*Katsuwonus pelamis*).

En España, se reportó la aparición de una larva de morfotipo II en la cavidad abdominal de una mujer de Zaragoza (Clavel *et al.*, 1993).

En el Perú, solo se han reportado dos casos probables por *A. physeteris* (s.l.) morfotipo II localizadas en el estómago de dos personas (mujer de 38 años y varón de 22 años) provenientes de Ica (Cabrera y Suarez, 2002).

La especie más estudiada ha sido el morfotipo I, donde incluso se ha demostrado una asociación entre el potencial patógeno y especie. Definiéndose como potencial a la capacidad de las

larvas de causar lesiones, adherirse a la pared gastrointestinal o penetrar en él (Romero *et al.*, 2013). En estudios in vitro se observó que *A. simplex* tiene más potencial para sobrevivir en condiciones ácidas y es más invasiva que *A. pegreffii*, de igual manera en estudios in vivo se vio mayor capacidad para adherirse a la pared gástrica e intestinal o penetrar a través de ellos (Arizono *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2013; Chan-Hyeok y Jeong-Ho, 2015).

Actualmente existen pocos trabajos relacionados a la patogenicidad de la larva de *Anisakis* sp. morfotipo II. En España, Romero *et al.* (2014) evaluaron mediante una infección experimental la patogenicidad de larvas del morfotipo I y II en ratas Wistar, donde se demostró el potencial patógeno de ambos y el tipo I presentó mayor capacidad que el morfotipo II. Asimismo, se reveló que el potencial patógeno de las especies *A. physeteris* y *A. paggiae* es similar a la de *A. pegreffii*.

En el Perú, el único caso es el de Cabrera *et al.* (1997) quienes demostraron que las larvas de *A. physeteris* (morfotipo II) obtenidas de *Scomber japonicus* “caballa” capturados en la costa del Pacífico presentaban gran capacidad para penetrar y adherirse a la mucosa gástrica de *Canis lupus familiaris* y se comprobó que tan solo una larva inoculada era capaz de producir hemorragia en el intestino del perro.

III. HIPÓTESIS

Hi: Las larvas (L3) de *Anisakis* spp. tipo II aisladas de *S. chiliensis chiliensis* tratadas con especias empleadas en la preparación del ceviche muestran potencial patógeno.

VARIABLES

Dependientes: número de larvas que se adhieren o penetran en algún órgano en el modelo murino.

Independientes: tipo de pre tratamiento que se somete a las larvas antes de la infección y horas de pre tratamiento.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Demostrar el potencial patógeno de la larva 3 morfotipo II de *Anisakis* spp. aislada de *S. chiliensis chiliensis* tratada con especias empleadas en la preparación del ceviche peruano, en modelo murino.

4.2. Objetivos específicos

- Establecer la prevalencia e intensidad parasitaria de *Anisakis* spp. larva 3 morfotipo II en *S. chiliensis chiliensis*.
- Demostrar los efectos patológicos de la infección con larvas 3 morfotipo II de *Anisakis* spp., tratadas en distintas mezclas de especias (*C. pubescens*, *Citrus* limón, *A. sativum* y *P. nigrum*) durante 1 y 3h, en los diferentes órganos del modelo murino.
- Determinar el efecto posible de los factores de tratamiento y tiempo sobre el número de larvas 3 morfotipo II de *Anisakis* spp. con potencial patógeno respecto al número de larvas inoculadas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se obtuvieron setecientos ochenta y siete especímenes (787) de *S. chiliensis chiliensis* durante el periodo de noviembre del 2018 a abril del 2019 del Terminal pesquero de Ventanilla (11°59'22"S 77°7'35"W) y algunos especímenes fueron brindados por la dirección general de recursos pelágicos del Instituto del Mar del Perú (2°04'01"S 77°09'28"W).

5.2. Colecta de larvas L3 de *Anisakis* spp. morfotipo II e identificación

Se aislaron larvas L3 de anisákidos de la superficie del intestino, estómago; así mismo, las incrustadas en el hígado, ciego, bazo y libres en la cavidad. Las larvas se colectaron en solución salina al 0.85% y se identificaron en el microscopio compuesto de acuerdo a las características descritas por Berland (1961), es decir, por la presencia de un ventrículo corto, unión del ventrículo e intestino recto y con la terminación de la cola en forma cónica y aguda.

5.3. Prevalencia e intensidad parasitaria

La cantidad de anisákidos que se encontraron en cada pez se muestran según dos parámetros, prevalencia e intensidad parasitaria. La primera se determinó como el porcentaje de peces parasitados por *Anisakis* sp. respecto a la población de peces examinados, mientras que la intensidad media de infección, como número total de parásitos con relación al número de hospederos parasitados.

5.4. Tratamiento de las larvas L3

Las larvas fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

- a) Sólo con jugo de *C. limon* "limón" (10 ml)
- b) Mezcla de *C. pubescens* "rocoto" al 5% con *C. limon*
- c) Mezcla de *A. sativum* "ajos" al 5%, *C. limon* y *P. nigrum* "pimienta" al 2%
- d) Solución placebo (solución salina)

Estas mezclas se dejaron en dos tiempos diferentes previos a la infección: 1 y 3 horas.

Los tiempos se tomaron según las recomendaciones que se dan para las preparaciones del ceviche, tal como se muestra en la revista “Cultura latina” del 2018, para lograr que la carne del pescado se encuentre en su totalidad cocinado o “marinado” (pescado blando u opaco). Posteriormente, cumplido los tiempos establecidos se hizo un lavado de las larvas en solución salina al 0.85% antes de la infección.

5.5. Infección experimental

Se emplearon 40 ratas Wistar de 4 a 5 meses de edad y con un peso de 150 -180 gr, se mantuvieron en jaulas adecuadas para las mismas. Se alimentaron con alimento estándar y agua potable. Las ratas fueron obtenidas del Instituto Nacional de Salud de la Sede de Chorrillos. Esta investigación se enfocó en la demostración de la capacidad patógena de la larva a través de la inoculación en las ratas Wistar indiferentemente del sexo.

Se utilizaron ratas en el estudio porque es un modelo de infección válido para evaluar el comportamiento de las larvas vivas de *Anisakis* spp. y los cambios histopatológicos en la zona de invasión al interior del huésped (Repiso *et al.*, 2013); además, es una animal manejable y de mayor tamaño respecto a otros modelos experimentales (ratón o hámster), así mismo son sensibles al proceso de infección ya que no pueden regurgitar ni vomitar lo que han deglutido anteriormente (Sánchez, 2015) y poseen varias características biológicas similares con los humanos (Navarro *et al.*, 2012) por lo que los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a lo que pueda suceder en ellos.

La distribución de las larvas previamente tratadas y la infección en ratas se realizó de acuerdo a la Tabla 1. La inoculación se efectuó por vía oral con una sonda nasogástrica número 6 adaptada a una jeringa de 10 ml con solución salina que permitió el paso de las larvas al estómago de las ratas.

Para estandarizar las cantidades de larvas a inocular de acuerdo a cada pretratamiento asignado, se realizó una prueba piloto previamente, donde se pudo conocer las cantidades mínimas de inoculación por grupo con capacidad de causar lesión en el animal o se puedan recuperar del tracto gastrointestinal, al menos una, sin ser degradada en su totalidad.

El proceso de infección de larvas por grupo y subgrupo se realizó utilizando 5 ratas, cada una de ellas se inoculó dejando tres días. Luego de 48 h post infección se sacrificaron a los animales con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg /kg); seguidamente, se hizo la disección con la finalidad de observar macroscópicamente las posibles lesiones con ayuda de un microscopio

estereoscopio. Las larvas encontradas libres fueron aisladas en solución salina y aquellas que se encontraban lesionando algún órgano fueron procesadas para histología.

Tabla 1.- Distribución e inoculación de larvas 3 de *Anisakis* spp. morfotipo II en ratas Wistar

Larvas 3 morfotipo II	Tratadas con especias						Sin tratamiento con especias (control)	
Grupos	I		II		III		IV	
Especias empleadas en el tratamiento de larvas antes de la infección	<i>C. pubescens</i> y <i>C. limón</i>		<i>C. limon</i>		<i>A. sativum</i> , <i>C. limon</i> y <i>P. nigrum</i>		Sustancia placebo (solución salina)	
Subgrupo	A	B	A	B	A	B	A	B
Horas de exposición de larvas en las especias	1h	3h	1h	3h	1h	3h	1h	3h
Nº de ratas infectadas	5	5	5	5	5	5	5	5
Mínimo-Máximo de larvas inoculadas por rata	9 -14	10-16	9-12	8-12	10-15	10-15	13-17	10-15
Promedio de larvas inoculadas	12	12	11	10	13	14	15	12

5.6. Procesamiento de los tejidos

Para el estudio histopatológico se aislaron los órganos lesionados de las ratas: estomago, hígado, músculo esquelético e intestino, así mismo se tomó algunos nódulos formados en el mesenterio. Estos fueron lavados en solución salina y luego se fijaron en formol neutro al 10% por 24 h a 48h Posteriormente se deshidrataron en una batería de alcoholes (70°, 75°, 85°, 96° y 100°) y se aclararon con xilol e infiltraron en parafina en el procesador automático, para seguidamente proceder a la preparación de los bloques en el sistema de inclusión de moldes. Los tejidos se cortaron utilizando un micrótopo (Thermo Scientific Microm HM 340 E Rotary Microtome). Las secciones de corte fueron de 4 micras y estas fueron coloreadas con la técnica de Hematoxilina-eosina de Harris (Humason, 1979). El procesamiento se realizó en el Laboratorio de Patobiología Acuática del Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

5.7. Examen histológico

Las láminas con los cortes histológicos fueron estudiadas y fotografiadas usando un microscopio Leica DM 750 con cámara digital incorporada (Laboratorio de la FCB, UNMSM).

Aprobación ética

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las recomendaciones metodológicas y éticas. La aprobación de ética para la ejecución del experimento fue hecha por el Comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina de la UNMSM según el Acta N°. 19-0115.

5.8. Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de la prueba experimental se aplicó el Análisis de Varianza (Anova) de dos factores con la finalidad de establecer si las variables (tratamiento y tiempo) o la interacción de estas realmente tenían un efecto sobre el número de larvas con potencial patógeno respecto al número de larvas administradas. Así mismo se empleó la Ley de Tukey para determinar el nivel de significancia entre los distintos tratamientos. El programa que se utilizó para los análisis mencionados anteriormente es el Minitab versión 18.

VI. RESULTADOS

6.1. PREVALENCIA E INTENSIDAD MEDIA PARASITARIA EN EL HOSPEDERO

Del total de especímenes evaluados el 47.5% (389/787) se encontraron infectadas con larvas tipo II de *Anisakis* spp. (Anexo 6) con una intensidad media de 1.3 larvas/pez (Tabla 2). Las larvas se encontraron libres o encapsuladas en el hígado, ciego, bazo, mesenterio y superficie del estómago e intestino. (Anexo 5).

Tabla 2. Prevalencia e intensidad parasitaria en 787 especímenes de *S. chiliensis chiliensis* “bonito” obtenidos del Terminal pesquero de Ventanilla e IMARPE, desde noviembre 2018 hasta abril 2019.

Muestreo	Peces examinados	Peces infectados	Prevalencia	LARVAS II	IM
1	25	11	44.00	12.00	1.09
2	17	4	23.53	6.00	1.50
3	18	9	50.00	12.00	1.33
4	22	7	31.82	8.00	1.14
5	48	24	50.00	34.00	1.42
6	12	5	41.67	8.00	1.60
7	24	15	62.50	18.00	1.20
8	17	8	47.06	12.00	1.50
9	56	17	30.36	25.00	1.47
10	29	6	20.69	10.00	1.67
11	36	13	36.11	14.00	1.08
12	15	10	66.67	12.00	1.20
13	25	12	48.00	12.00	1.00
14	13	7	53.85	11.00	1.57
15	11	5	45.45	9.00	1.80
16	13	8	61.54	10.00	1.25
17	15	9	60.00	13.00	1.44
18	27	9	33.33	10.00	1.11
19	13	5	38.46	9.00	1.80
20	27	12	44.44	14.00	1.17
21	18	9	50.00	11.00	1.22
22	60	41	68.33	63.00	1.54
23	45	27	60.00	30.00	1.11
24	23	6	26.09	7.00	1.17
25	12	4	33.33	5.00	1.25
26	45	24	53.33	27.00	1.13
27	48	33	68.75	36.00	1.09
28	43	35	81.40	37.00	1.06
29	30	14	46.67	17.00	1.21

6.2. DEMOSTRACIÓN DE LOS EFECTOS PATOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN CON LARVAS 3 MORFOTIPO II DE *Anisakis* spp., TRATADAS EN DISTINTAS MEZCLAS DE ESPECIAS (*C. pubescens*, *C. limón*, *A. sativum* y *P. nigrum*) DURANTE 1 Y 3H, EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DEL MODELO MURINO

Después de 48 h de la infección orogástrica se encontraron larvas vivas con capacidad de causar lesiones a lo largo del tracto gastrointestinal y migrar hacia otros órganos. Mediante un examen visual bajo un microscopio estereoscopio Leica ES2 se anotó las localizaciones, los efectos y el número de las larvas encontradas en los diferentes órganos y tejidos (Tabla 3).

El porcentaje total de larvas con potencial patógeno por grupo y subgrupos encontrados en los diferentes órganos y tejidos resultó del promedio de larvas encontradas en las 5 ratas utilizadas en cada serie.

GRUPO I

Larvas sometidas a *C. pubescens* “rocoto” con *C. limon* “limón”

Durante 1 hora

Luego de inocular a las 5 ratas con larvas sometidas al tratamiento indicado, resultó que el 16.3% (10/61) de las larvas infectadas presentaron potencial patógeno, el 11.5% (7/61) fueron capaces de cruzar del tracto gastrointestinal hacia la cavidad abdominal y alojarse en ella y el otro 4.8% (3/61) causaron lesiones en el hígado y en el tubo digestivo (intestino y estómago).

Cavidad abdominal

El 42.8% (3/7) de las larvas encontradas en la cavidad abdominal estaban libres, el 28.6% (2/61) se hallaron incrustadas en el mesenterio y omento mayor. Finalmente, el otro 28.6 % (2/61), formaron pseudoquistes de 0.3 mm de diámetro inmerso en la grasa abdominal dorsal de la rata.

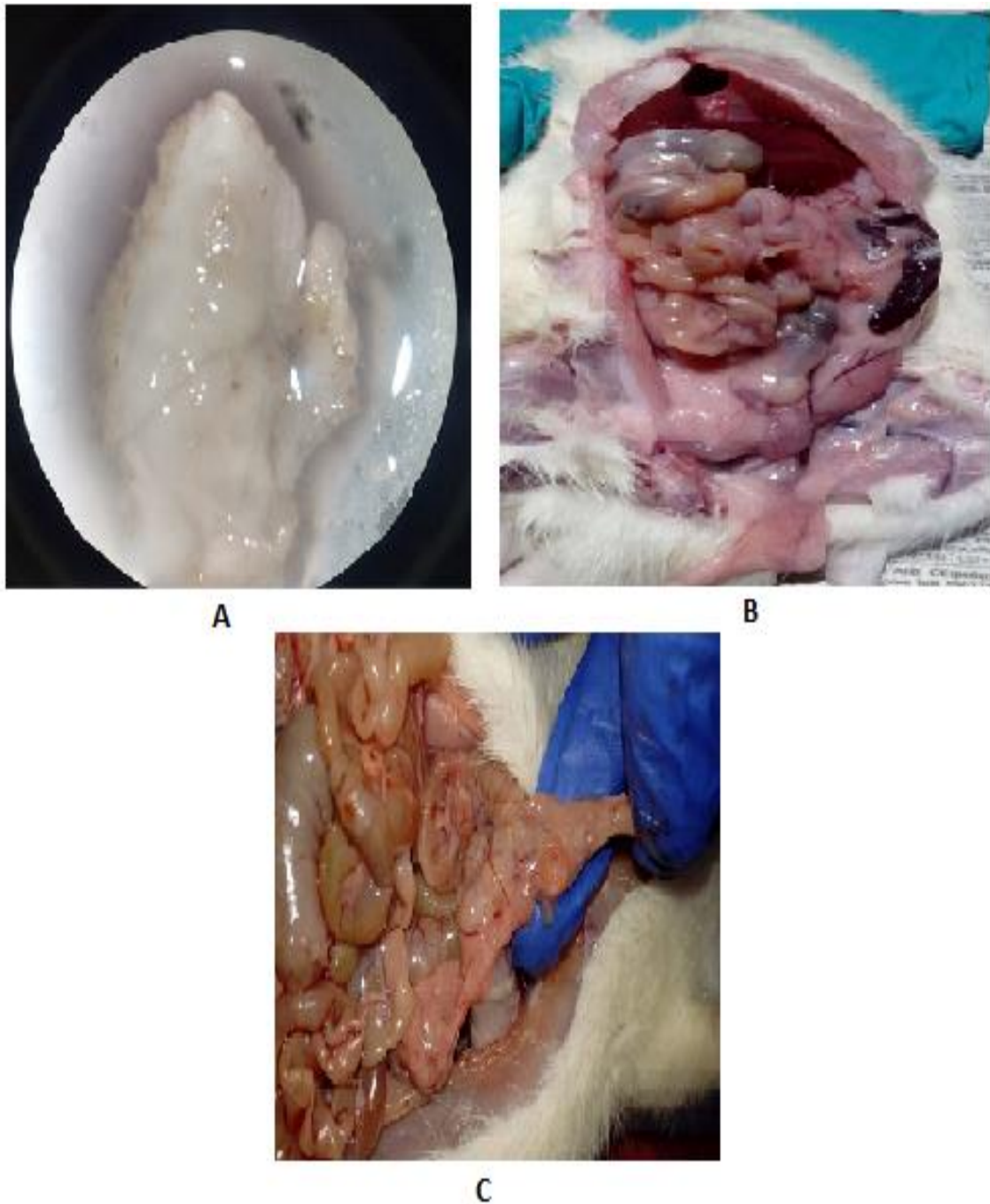


Fig. 1. A-C Larvas pretratadas con *C. pubescens* y *C. limon* – 1h encontradas en la cavidad abdominal. (A) Pseudoquiste inmerso en grasa abdominal. (B) Larva incrustada en omento mayor. (C) Larva incrustada en mesenterio.

Hígado

El 1.6 % (1/61) de las larvas se halló incrustadas sobre la cápsula de Gibson del hígado.



Fig. 2. Larva pretratada con *C. pubescens* y *C. limon* -1h en la superficie del hígado.

Intestino delgado

Se observaron manchas hemorrágicas de 0.3 a 0.5 mm de diámetro; así mismo, se observó que el 1.6% (1/61) de las larvas inoculadas penetraron la mucosa intestinal.



A



B



C

Fig. 3. A-C Lesiones en el intestino delgado de ratas infectadas con larvas pretratadas con *C. pubescens* y *C. limon* -1h. (A-B) Hemorragias en el íleon y duodeno. (C) Larva penetrando la mucosa intestinal.

Estómago

El 1.6% (1/61) de las larvas infectadas se encontraron adheridas a la mucosa gástrica de la parte glandular de la curvatura mayor del estómago y en la zona de incrustación se halló hemorragia de 0.5 mm de diámetro.



Fig. 4. Rotura de vasos sanguíneos en la curvatura mayor del estómago de rata infectada con larvas pretratadas con *C. pubescens* y *C. limon* – 1h.

Durante 3 horas

El 8.4% (5/60) de las larvas del grupo I sometidas durante este tiempo, resultaron ser capaces de causar afección en el modelo murino. El 5 % (3/60) atravesaron el tracto gastrointestinal y se encontraron libres en la cavidad y el 3.6%, causaron lesión solo a lo largo del tracto digestivo.

Cavidad abdominal



Fig. 5. Larva pretratada con *C. pubescens* y *C.limon* – 3h libre en la cavidad

Intestino delgado

El 1.7% (1/60) de las larvas fue capaz de formar un pseudoquiste purulento de aproximadamente 0.6 mm de diámetro en la pared intestinal



Fig. 6. Nódulo en la superficie intestinal de la rata infectada con larvas pretratadas con *C. pubescens* y *C. limon* -3h.

Estómago

El otro 1.7 % (1/ 60) de las larvas formó un pseudoquiste en la superficie del fundus del estómago de aproximadamente 5mm de diámetro.

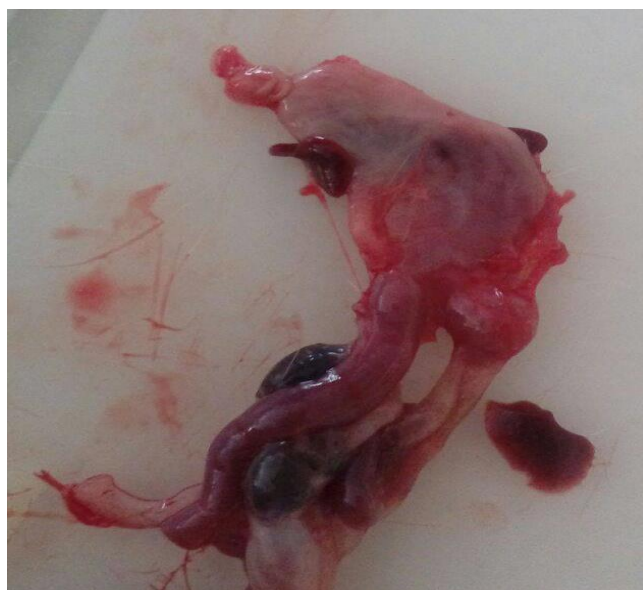


Fig. 7. Nódulo en el fundus del estómago de rata infectada con larva pretratada con *C. pubescens* y *C.limon* -3h .

Hallazgos histopatológicos en los diferentes órganos afectados por larvas grupo I

Hígado

Corte histológico de la zona de incrustación de la larva

En el corte se muestra la parte anterior de la larva en la superficie del hígado, provocando una hepatitis eosinofílica leve .

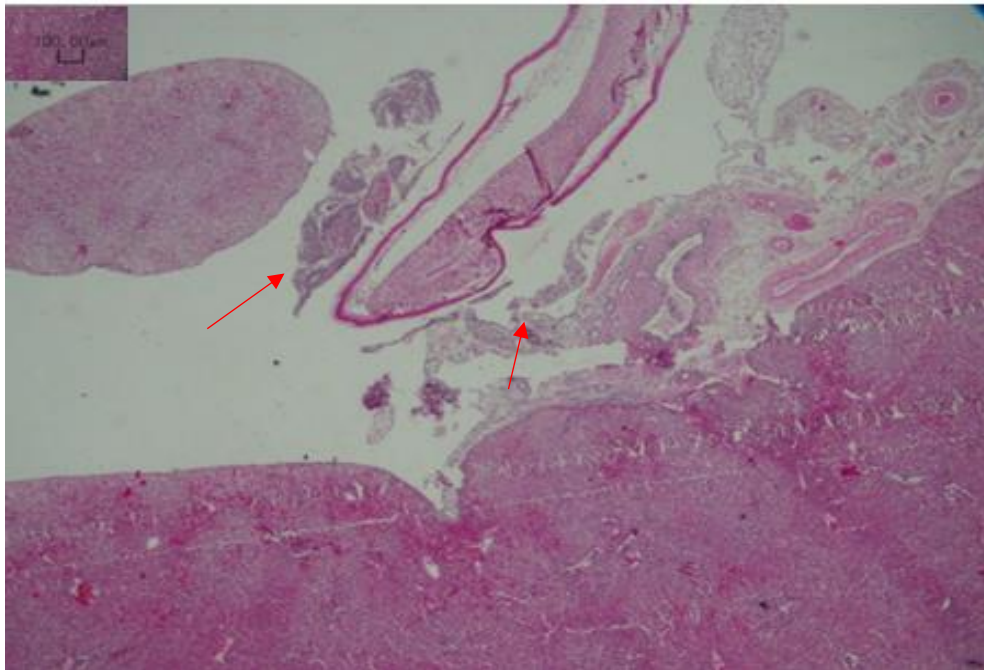


Fig. 8. Lesión en el hígado de rata infectada con larva pretratada con *C. pubescens* y *C. limon*- 1h (aumento x10).

Intestino

Corte histológico de sección hemorrágica

Se observa rotura de vasos sanguíneos en la capa muscular y en la serosa del intestino con infiltración de eosinófilos en la mucosa.

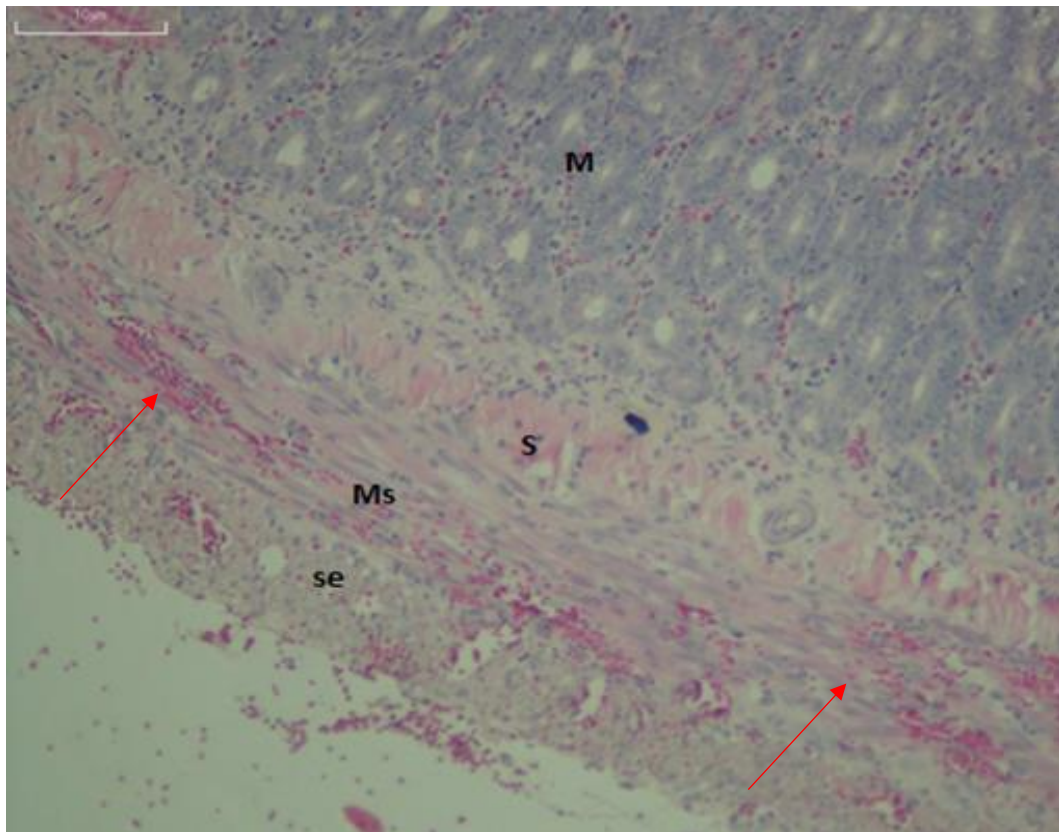


Fig. 9. Corte transversal del intestino de rata infectada con larva pretratada con *C. pubescens* y *C. limon*- 1h, se observa la capa muscular (Ms) y la serosa (se) afectadas. Submucosa (S), Mucosa (M).

Estómago

Corte histológico del nódulo purulento en el fundus

En el corte se visualizaron secciones transversales de la larva tratada durante 3h, ocasionando una reacción inflamatoria severa de tipo eosinofílica con tendencia a una formación granulomatosa que rodea al parásito.

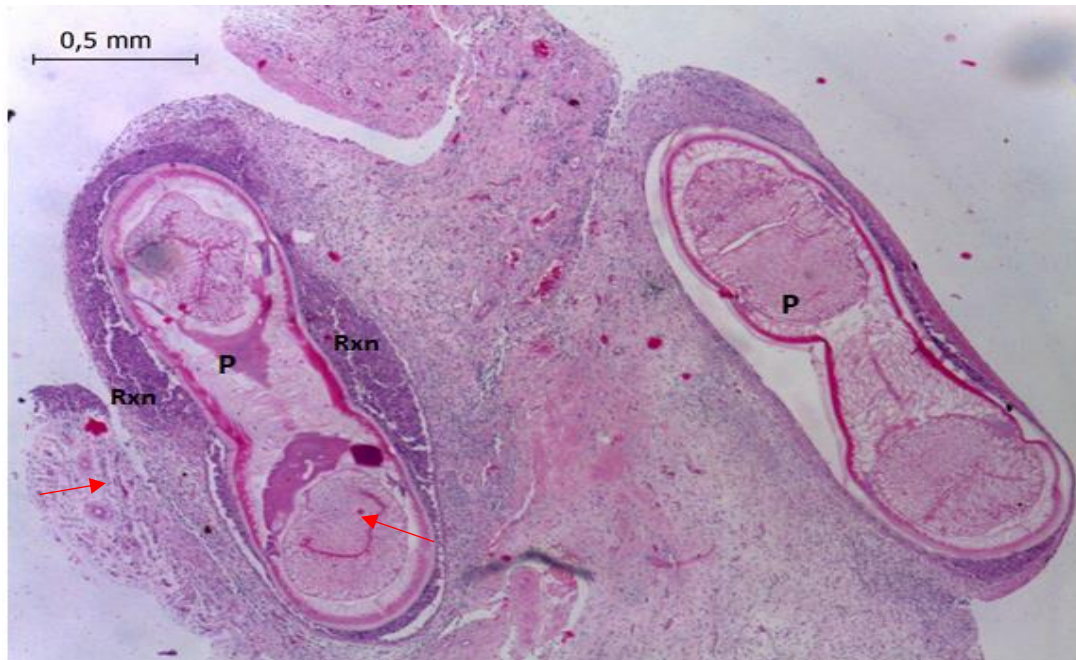


Fig. 10. Corte transversal del parásito (P) tratada con *C. pubescens* y *C. limon*- 3h rodeada de reacción inflamatoria (Rxn).

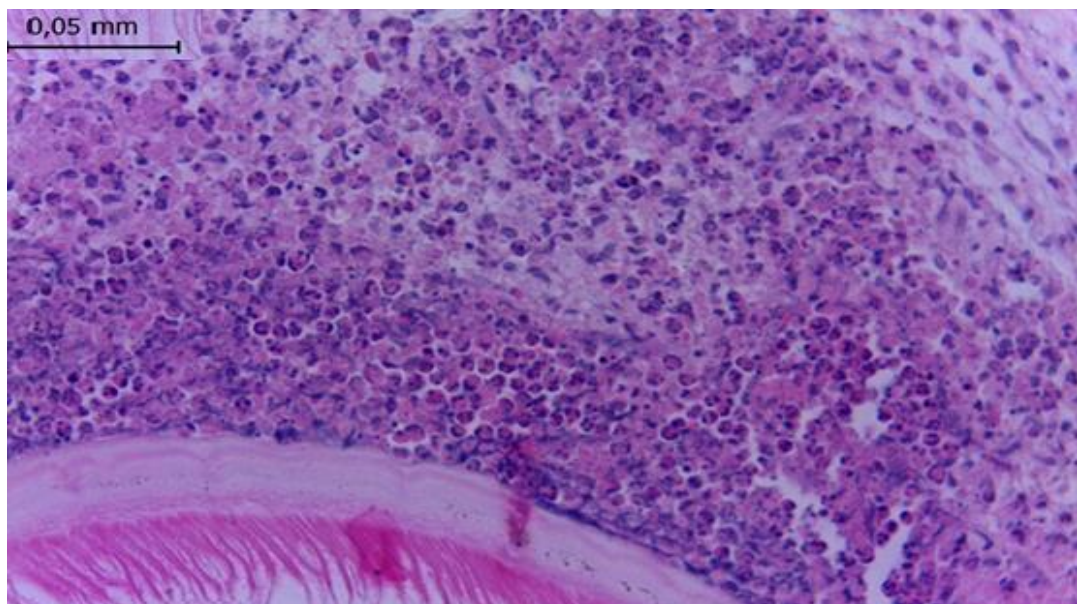


Fig. 11. Exudado eosinofílico de reacción inflamatoria anterior causada por larva tratada con *C. pubescens* y *C. limon* -3h

GRUPO II

Larvas pretratadas solo con *C. limon* "limón"

Durante 1 hora

El 24,1% (13/54) de las larvas inoculadas presentaron potencial patógeno. El 18.5 % (10/54) de las larvas fueron capaces de perforar el tracto gastrointestinal y alojarse en la cavidad. El 5.6% (3/54) restante lesionaron a nivel intestinal y extra gastrointestinal .

Cavidad abdominal

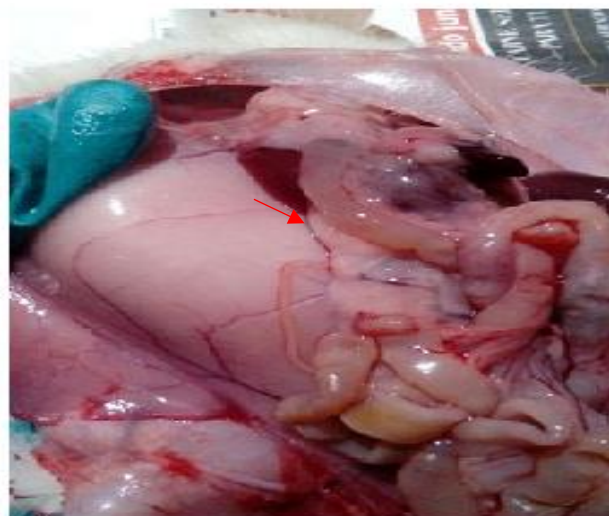
El 70% (7/10) de las larvas encontradas fuera del tracto digestivo se hallaron incrustadas en el omento mayor, mesenterio y grasa abdominal. El 30% (3/10) restante se encontraron libres.



A



B



C

Fig. 12. A-C Larvas pretratadas con *C. limon*- 1nen la cavidad abdominal. (A) Incrustada en el mesenterio. (B) En el omento mayor. (C) En la grasa abdominal.

Músculo abdominal

El 3.7% (2/54) de las larvas infectadas se encontraron penetrando este órgano.



Fig. 13. Larva pretratada con *C. limon* – 1h introduciéndose al músculo abdominal de la rata.

Intestino delgado

El 1.9% (1/54) de las larvas fueron capaces de formar un quiste purulento de 5 mm de diámetro en la superficie intestinal. La larva dejó un orificio perceptible en el órgano por donde probablemente migró hacia la superficie.



A



B

Fig. 14 .A-B Efectos de la infección con larvas pretratada con *C. limon* – 1h en el intestino. (A) Pseudoquiste en la superficie intestinal. (B) Agujero en el intestino rodeado de una pequeña mancha hemorrágica.

Durante 3 horas

El 12,1% (6/49) de las larvas inoculadas presento capacidad patógena. El 6.1% (3/49) traspasaron hacia la cavidad y se alojaron en este. El otro 6% (3/49) a nivel gástrico y extra gastrointestinal.

Cavidad abdominal

El 66.7 % (2/3) de las larvas que lograron atravesar el tracto digestivo se incrustaron en el omento mayor y mesenterio y el 33.3% (1/3) quedaron libres.

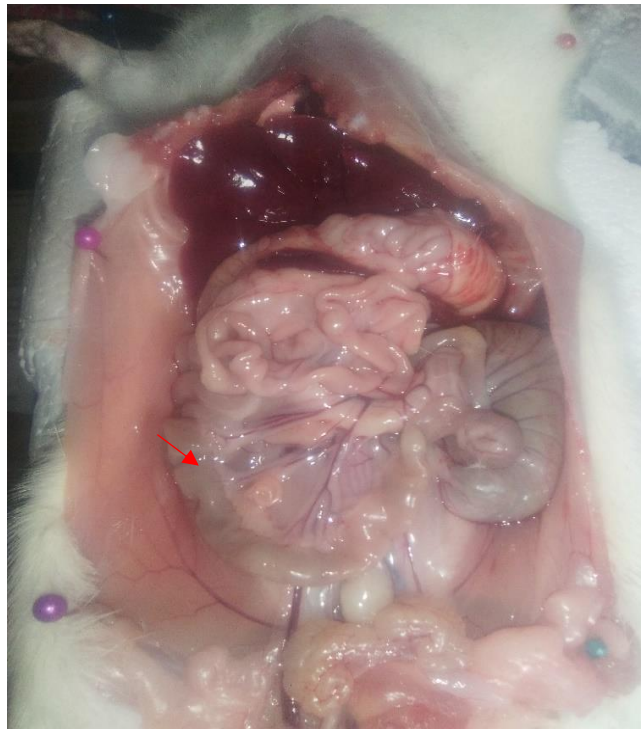


Fig. 15. Larva pretratada con *C.limon* – 3h incrustada en el mesenterio.

Hígado

El 2% (1/49) de las larvas infectadas fueron capaces de formar un pseudoquiste en el lóbulo medial izquierdo del hígado.

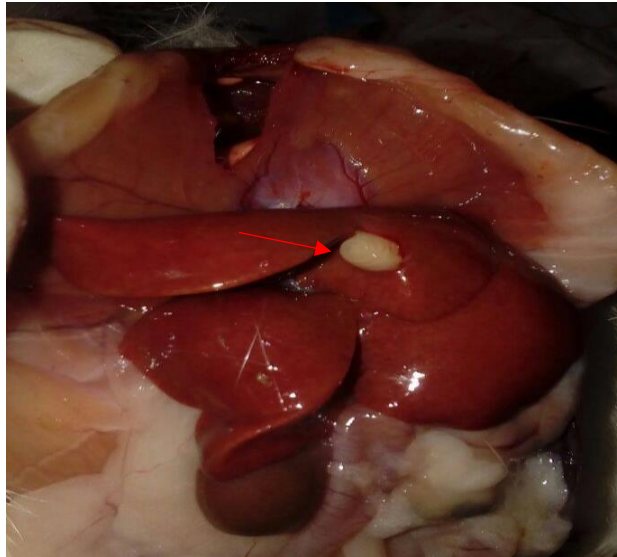


Fig. 16. Nódulo en la superficie del hígado de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* – 3h.

Músculo abdominal

El 2 % (1/49) restante de las larvas se introdujeron en el músculo dorsal abdominal

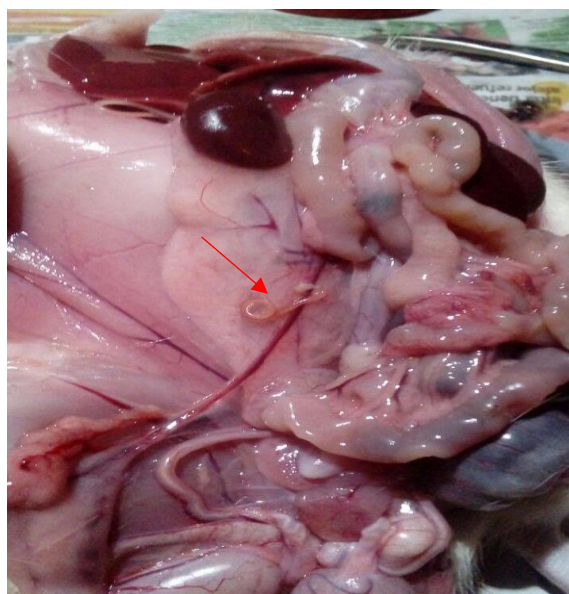


Fig. 17. Larva pretratada con *C. limon* – 3h impregnada al músculo.

Estómago

El 2 % (1/49) de las larvas inoculadas se encontró anclada a la pared gástrica en la parte glandular de la curvatura mayor. En la zona de penetración se observa una úlcera hemorrágica.



Fig. 18. Hemorragia en parte glandular del estómago de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* – 3h.

Hallazgos histopatológicos de los órganos afectados por las larvas del grupo II

Hígado

Corte histológico de un pseudoquiste sobre el lóbulo medial izquierdo del órgano

Se aprecia que el pseudoquiste se localiza sobre la superficie del hígado (Cápsula de Glisson) y dentro de este se halló segmentos de la larva ocasionando una hepatitis eosinofílica parasitaria difusa . Se observó necrosis coagulativa de los hepatocitos que se encuentran adyacente al parásito (Fig.21), degeneración de la grasa y hemorragia difusa (Fig. 22) .



Fig. 19. Pseudoquiste (Q) en la superficie del hígado (H) de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* – 3h.

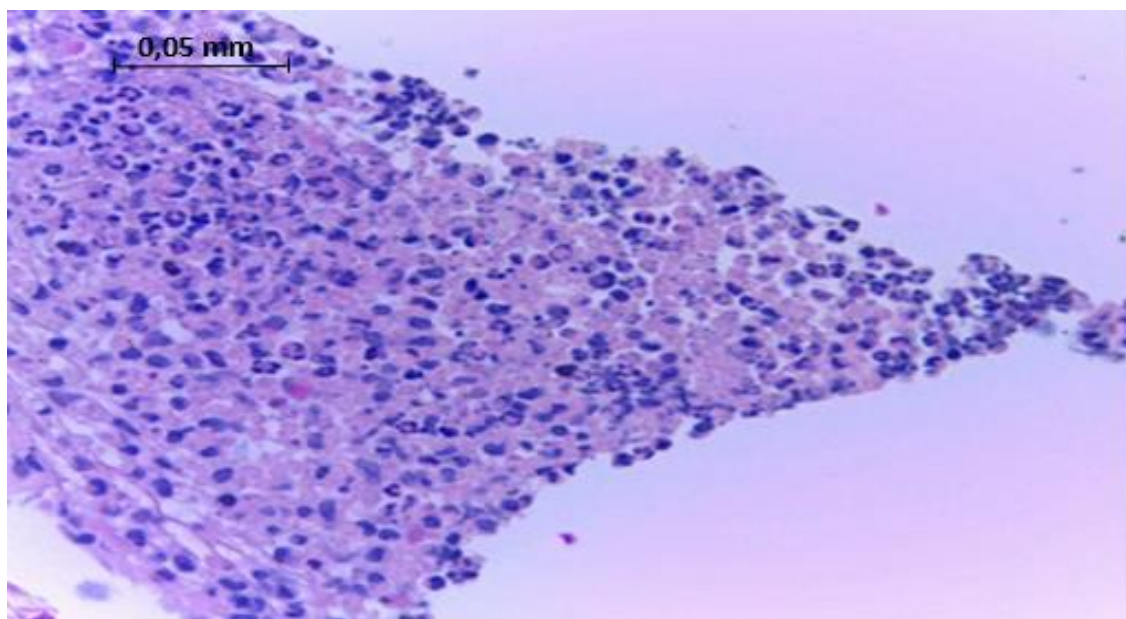
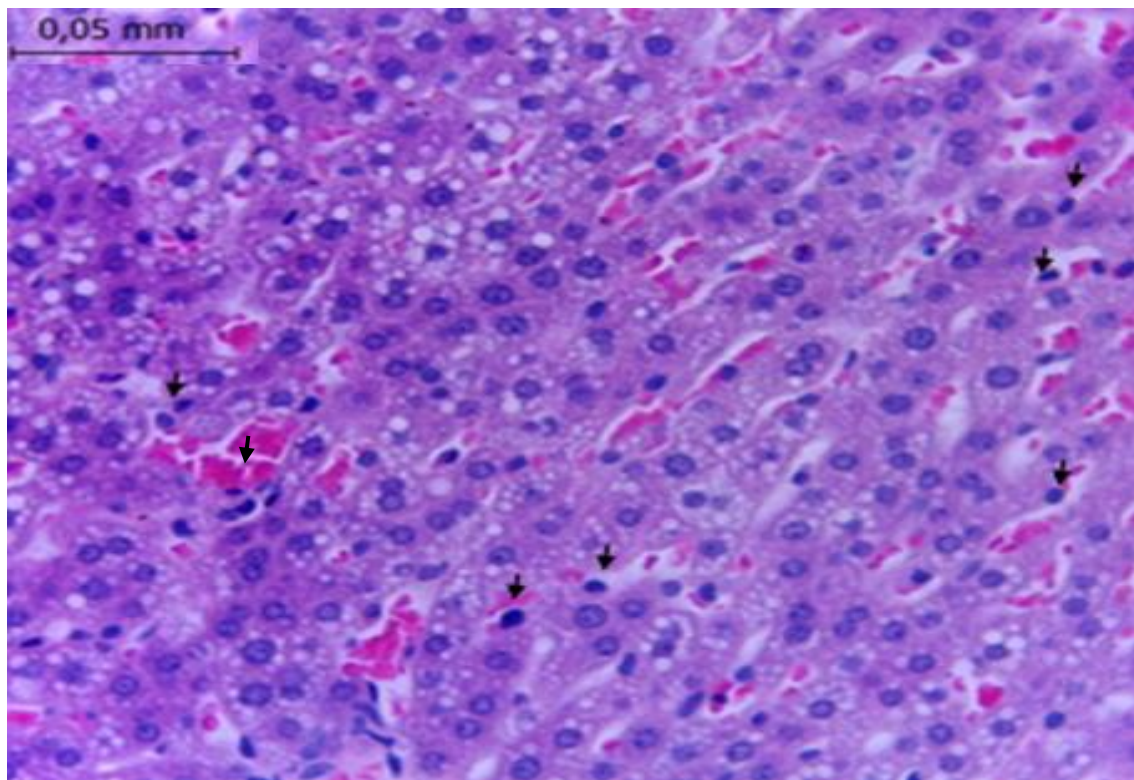
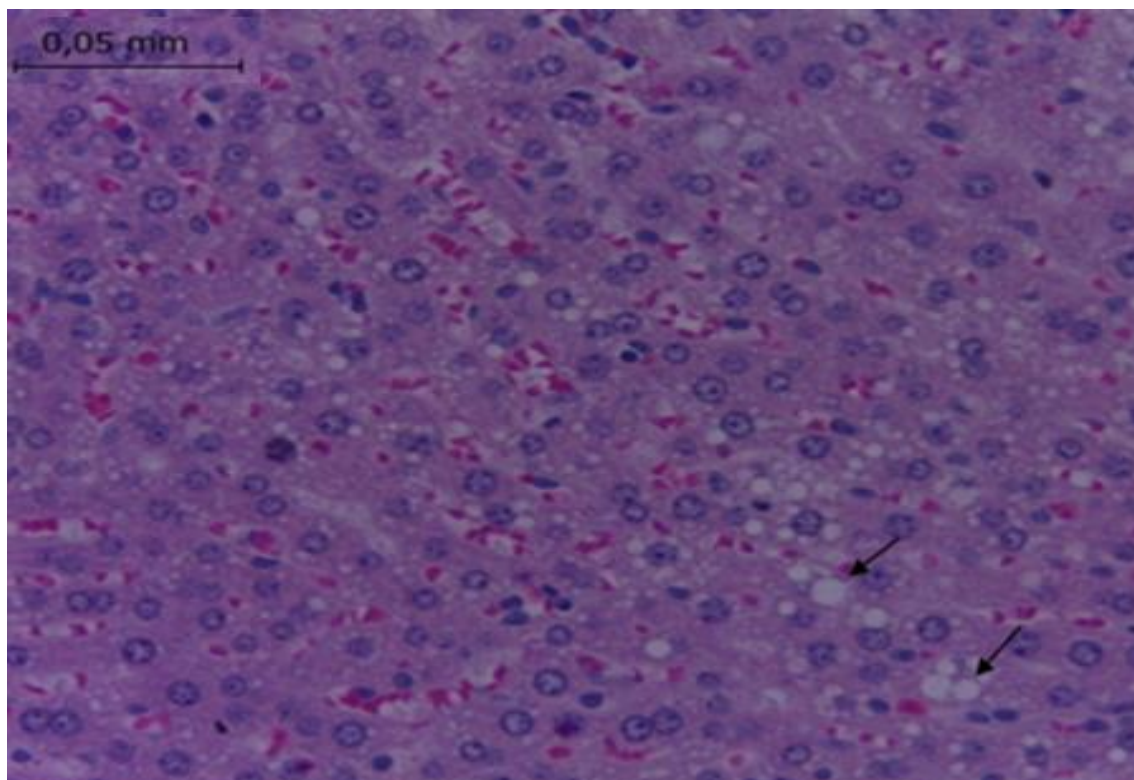


Fig. 20. Exudado eosinofílico de lesión anterior en mayor aumento (aumento x40) causado por larva pretratada con *C.limon*.



A



B

Fig. 21. Hallazgos encontrados en el hígado de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* – 3h A. Necrosis de los hepatocitos, se muestra el núcleo picnótico. B. Degeneración de la grasa.

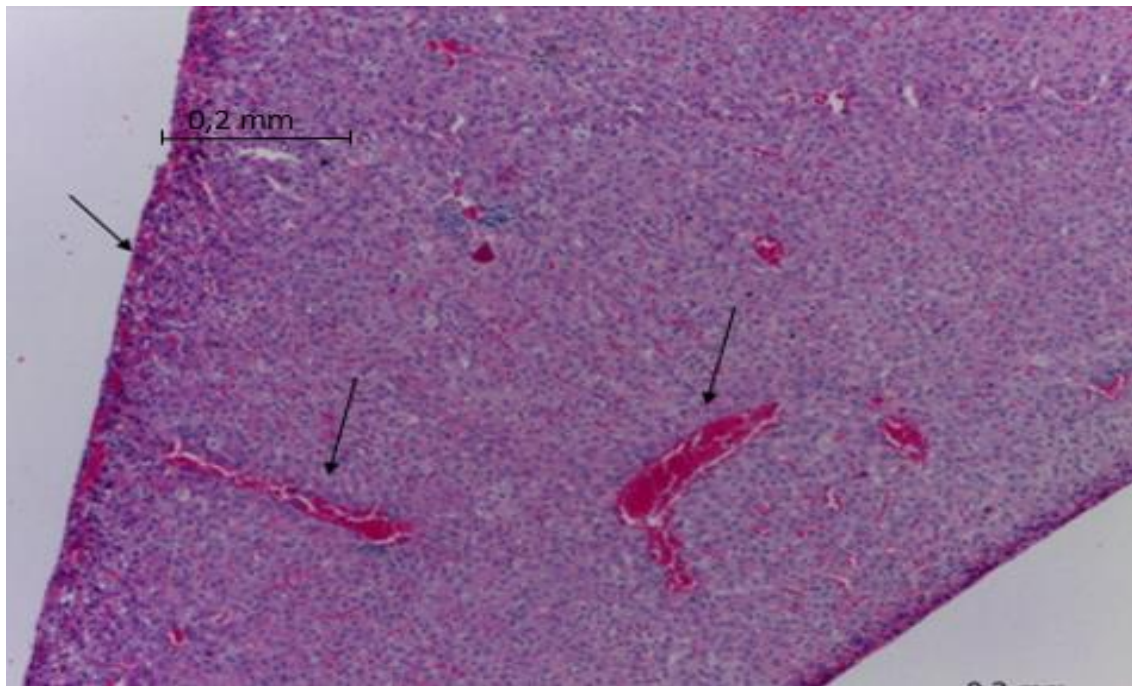


Fig. 22. Hemorragia difusa en superficie capsular del hígado de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* – 3h.

Músculo abdominal

Corte histológico de larva fijada al tejido

Se observa la penetración del extremo anterior del parásito hasta el nivel del ventrículo en el músculo ocasionando una miositis de tipo eosinofílico focal de curso agudo; esta reacción inflamatoria aun es incipiente a diferencia de lo que se observa en otros órganos. También en el corte se puede observar la ruptura de la cutícula del parásito tratado solo con *C. limon* (Fig. 23 A).

En otro parte del corte, en el tejido muscular adyacente al parásito, se observó miositis de tipo supurativa (predominancia de exudado neutrofílico) fibrinoide multifocal (Fig. 24). Así mismo se halló necrosis coagulativa fibrinoide de las células musculares estriadas (Fig. 25).

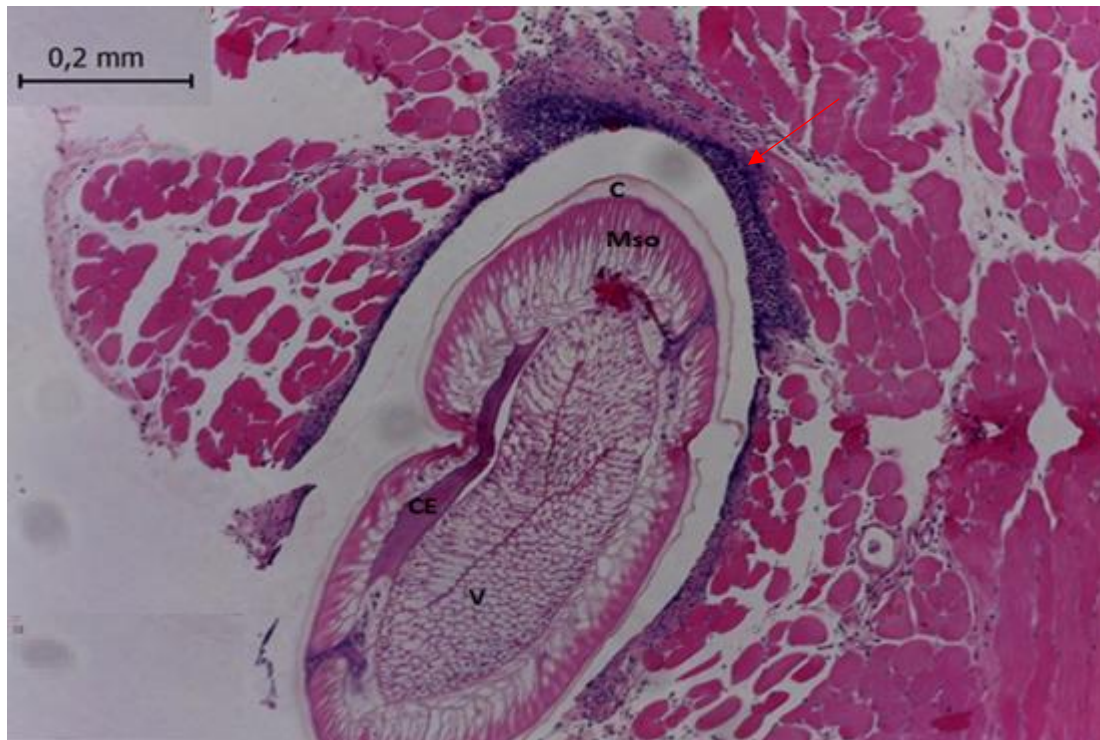


Fig. 23. Miositis de tipo eosinofílica focal de curso agudo parasitario. Migración de la larva pretratada con *C. limon* -1h a través de las fibras musculares originando una reacción inflamatoria inicial.

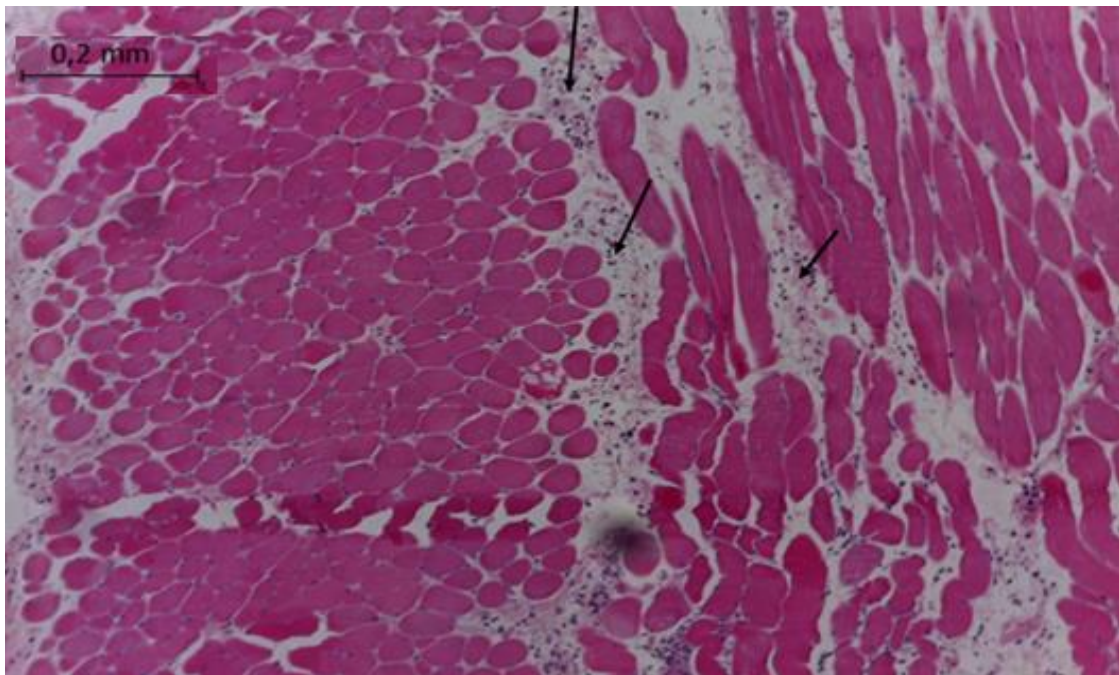


Fig 24 . Miositis de tipo supurativa fibrinoide multifocal parasitaria en tejido junto a la larva pretratada con *C. limon*- 1h.

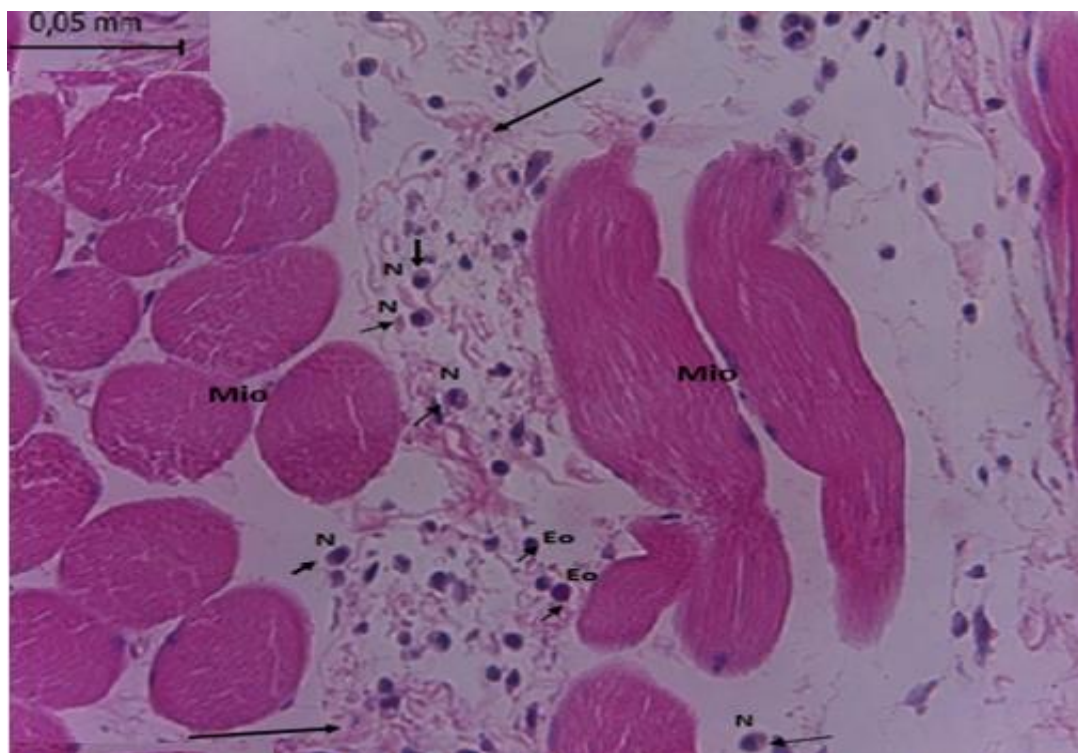


Fig. 25. Necrosis coagulativa. Lesión anterior en mayor aumento (magnificación x 40) se muestra los neutrófilos (N), eosinófilos (Eo) y fibrina (F) entre miofibrillas musculares (Mio).

Intestino

Corte histológico de un pseudoquiste ubicado en la pared intestinal

En el corte se observó que el nódulo estaba formado por segmentos del parásito y se localizaba en la serosa del intestino, rodeada de reacción inflamatoria eosinofílica severa (Fig. 28). La larva provocó una enteritis eosinofílica en la luz intestinal, también se halló pérdida de arquitectura de la mucosa, así como también de la capa muscular producto de la migración de la larva hacia fuera del tracto intestinal.

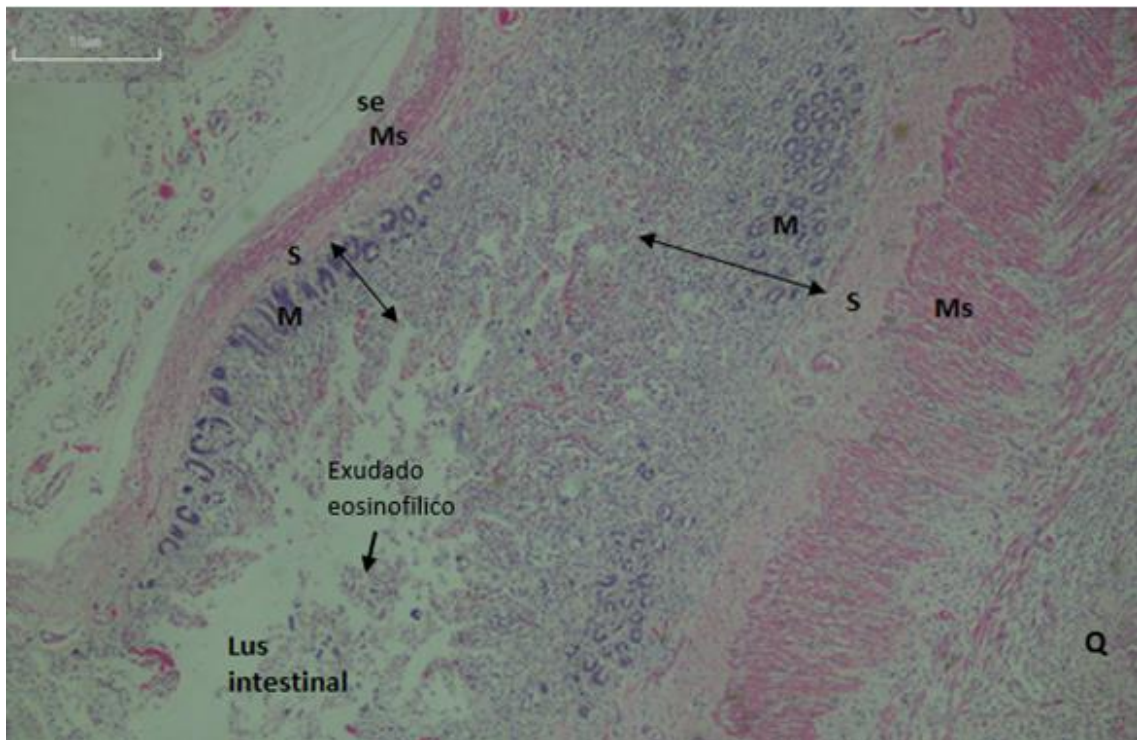


Fig. 26. Corte del intestino con parte del pseudoquiste (Q) de rata infectada con larvas pretratadas con *C. limon* -1h se observa alteración de la mucosa (M) y capa muscular (Ms). Submucosa (s) y Serosa (se).

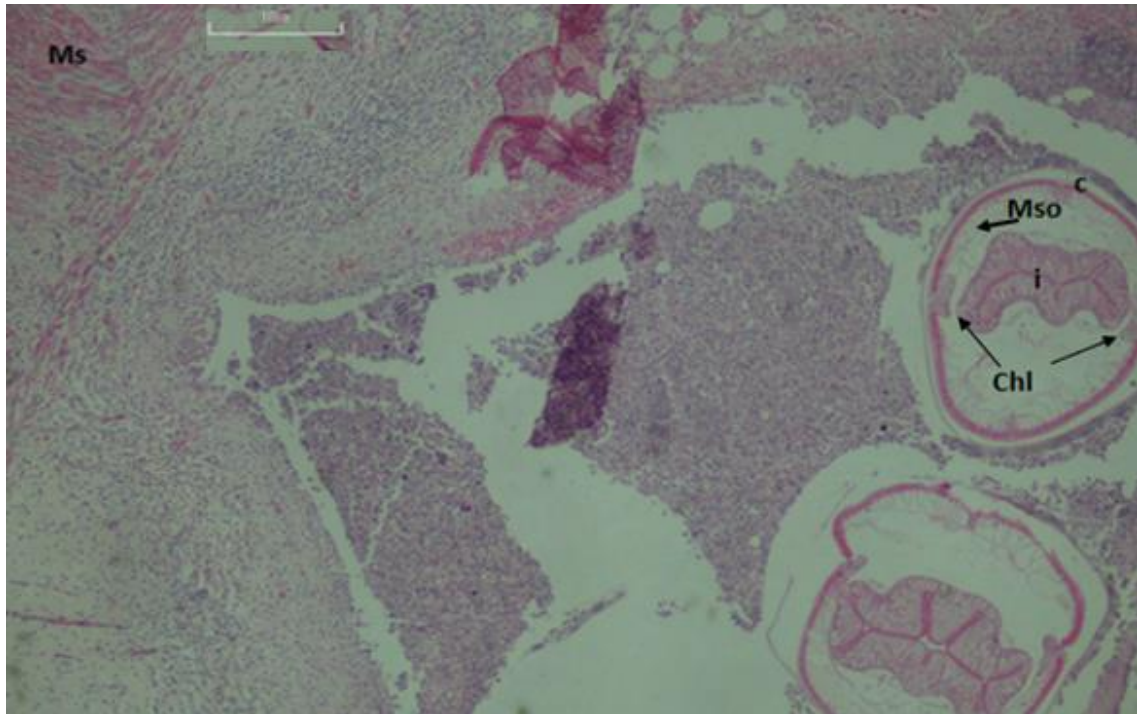


Fig. 27. Parte del pseudoquiste unida a la capa muscular del intestino. Se muestra corte transversal de la larva a nivel del intestino (i) donde es visible los cordones hipodermes bilobulados (Chl) así como también la musculatura somática (Mso) y la cutícula (c).

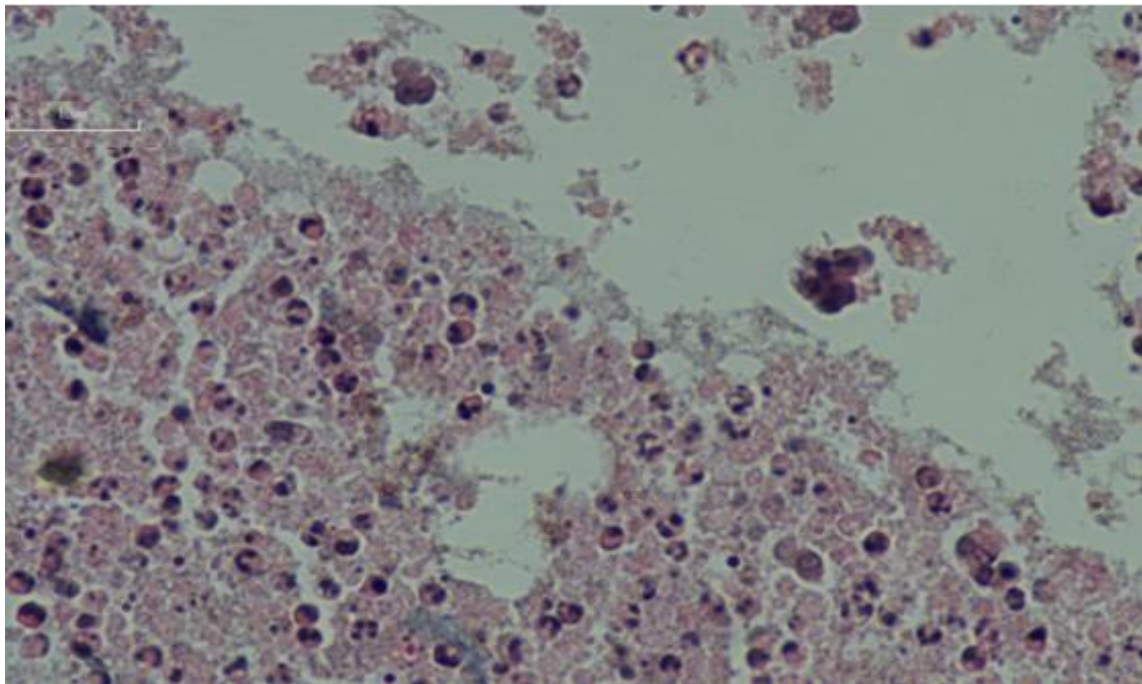


Fig. 28. Exudado eosinofílico en la luz intestinal de rata infectada con larvas pretratadas con *C.limon*- 1h (Medida= 10um).

Estómago

Corte histológico de la zona de perforación de la larva en el órgano

En el corte histológico se observaron elementos circulares que corresponden a las secciones transversales de la larva, localizadas entre la capa muscular y la serosa de la pared del estómago, rodeada por exudado de tipo eosinofílico ocasionando una gastritis de tipo eosinofílica focal.

También se observó gran afección de la capa muscular debido al trauma mecánico y atrofia severa en la mucosa gástrica y lisis total de las vellosidades del epitelio (Fig. 30).

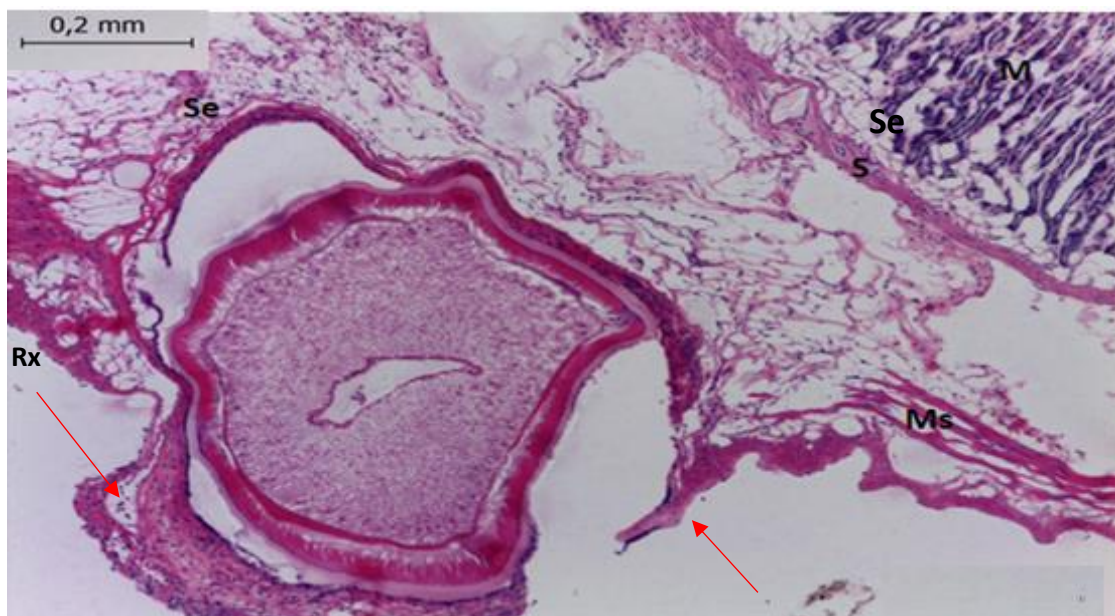


Fig. 29. Larva pretratada con *C. limon* -3h rodeada de reacción inflamatoria (Rx) perforando la capa muscular (Ms) y serosa (se) del estómago.

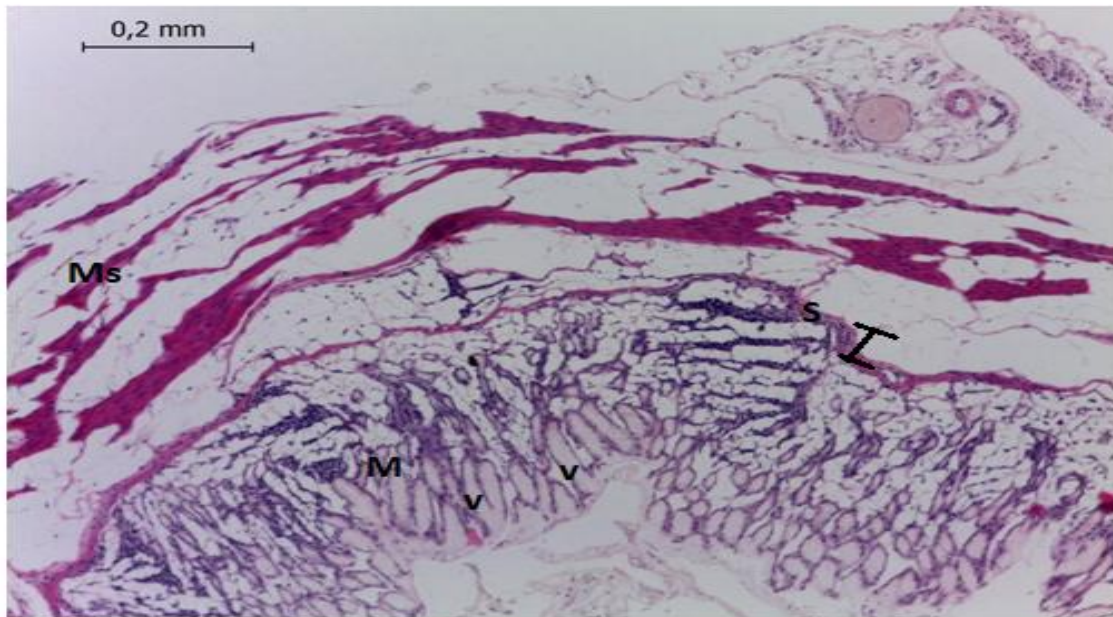


Fig. 30. Atrofia de la capa muscular del estómago de rata infectada con larvas con *C. limón*- 3h. Capa submucosa (s), vellosidades intestinales (v), capa muscular (Ms), capa mucosa (M) y capa serosa (Se).

Grupo III

Larvas pretratadas con *A. sativum* "ajos", *C. limon* "limón" y *P. nigrum* "pimienta"

Durante 1 hora

El 23.4 % (15/64) de las larvas inoculadas poseen potencial patógeno. El 20.2 % (13/64) migraron hacia la cavidad y se albergaron en ella y el 3.2% (2/64) causaron lesión al tejido muscular e intestino delgado.

Cavidad abdominal

El 38.5% (5/13) de las larvas que fueron capaces de atravesar hacia esta zona se incrustaron en la grasa abdominal y mesenterio, el otro 38.5% (5/13), formaron pseudoquistes purulentos de 5 a 6mm en el mesenterio, omento mayor e inmerso en la grasa abdominal dorsal y el 23% (3/13) restante se encontraron libres.

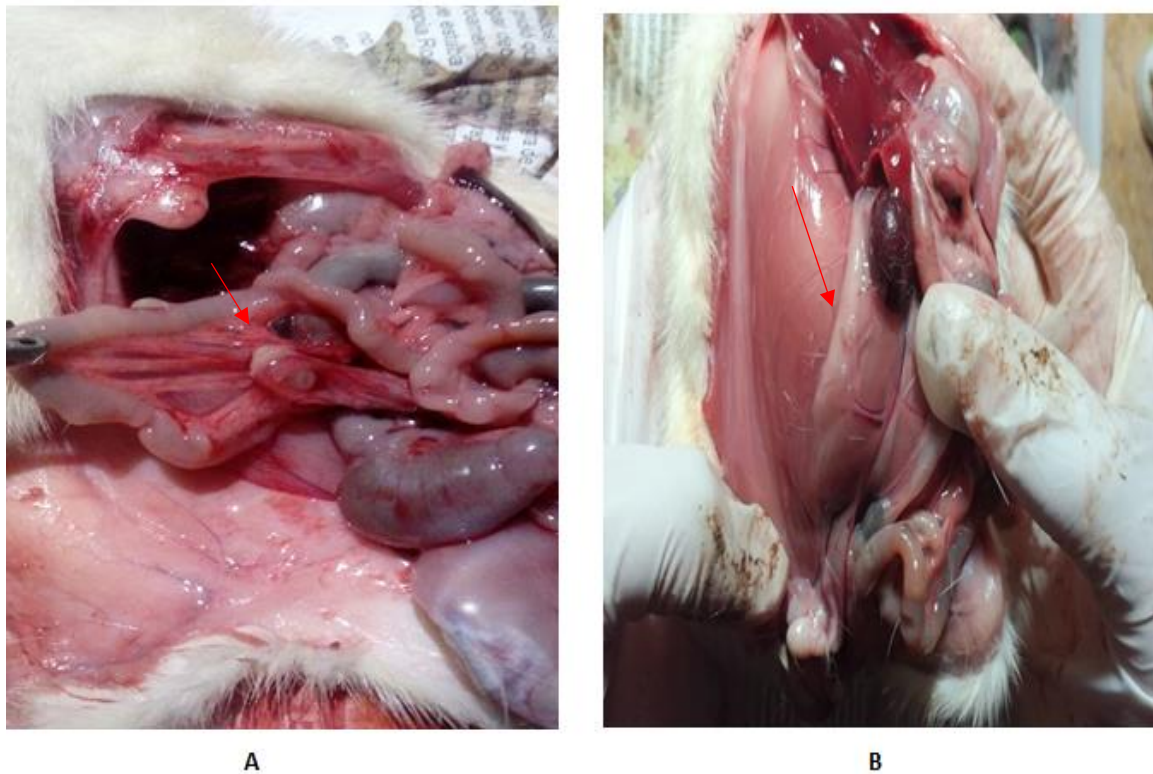


Fig. 31. Nódulos formados por larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -1 h (A) En el mesenterio y (B) En la grasa abdominal.

Intestino delgado

El 1.6% (1/64) de las larvas afectó este órgano formando un pseudoquiste purulento en la pared intestinal rodeada de manchas hemorrágicas.

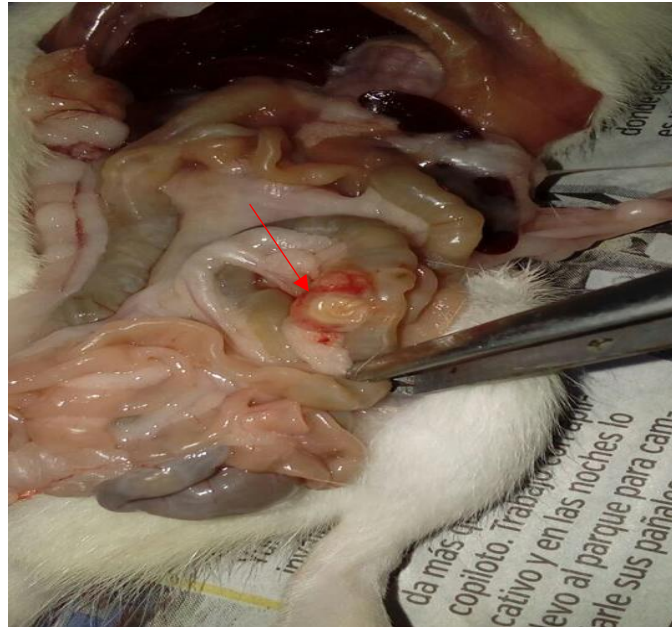


Fig. 32. Nódulo en la superficie intestinal de rata infectada con larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -1h.

Músculo abdominal

El 1.6% (1/54) de las larvas penetraron el músculo abdominal dorsal.



Fig. 33. Larva pretratada con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -1h incrustada en el tejido muscular.

Durante 3 horas

El 10.5% (7/66) de las larvas inoculadas presentaron capacidad patógena. El 6% (4/66) de las larvas patógenas lograron perforar la pared gastrointestinal y migrar hacia la cavidad donde permanecieron. El 4.5 % (3/66) afectaron el tracto intestinal y el tejido muscular.

Cavidad abdominal

El 3 % (2/66) de las larvas se encontraron libres en la cavidad y el otro 3% (2/66) se adhirió al mesenterio y grasa abdominal.

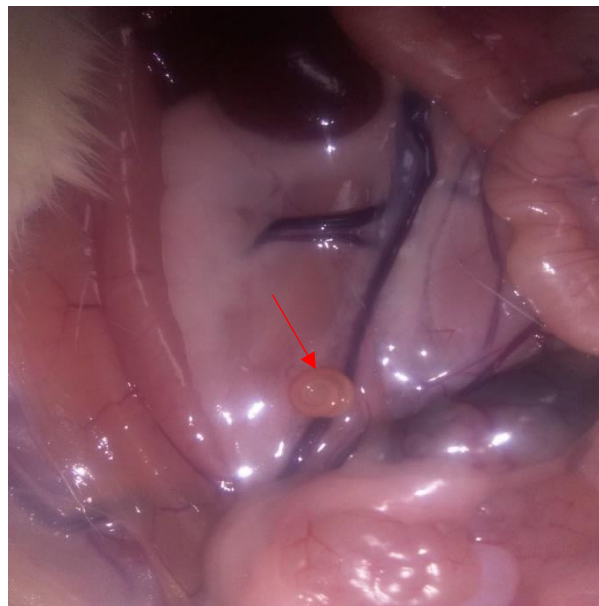


Fig. 34. Larva pretratada con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* - 3h en el mesenterio.

Intestino

El 1.5% (1/66) de las larvas se incrustaron en el intestino grueso (colon ascendente) mientras que el 1.6 % (1/66) formaron quistes de 6mm de longitud en el intestino delgado.



Fig. 35. A-B Efectos de las larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -3h en el intestino. (A) Nódulo en la superficie del intestino delgado. (B) Incrustada en el intestino grueso.

Músculo abdominal

El 1.5 % (1/66) de las larvas lograron penetrar el músculo.

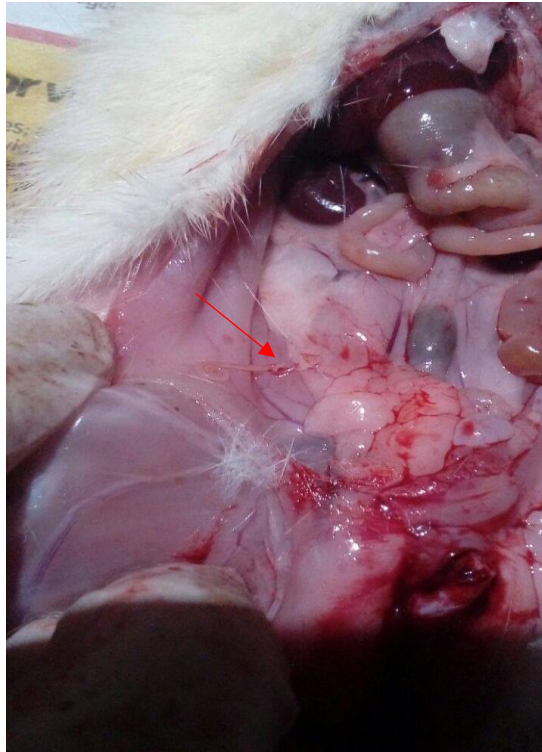


Fig. 36. Larva pretratada con *A. sativum*, *C. limon* y *P.nigrum* -3h en el tejido muscular.

Hallazgos histopatológicos en tejidos y órganos afectados por la larva del grupo III

Músculo abdominal

Corte histológico de la larva penetrando al tejido muscular

Se muestra la perforación de la larva a nivel ventricular, rodeada de una inflamación leve Fig. 37) provocando una miositis de tipo eosinofílica focal aguda. Así mismo, se aprecia hemorragia intersticial, edema entre miofibrillas y necrosis focal coagulativa de las células musculares (Fig. 38).



Fig. 37. Corte transversal de la larva pretratada con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum*- 1h inmersa en el tejido muscular donde se observa el ventrículo (v), la célula excretora (CE), cordones hipodérmicos bilobulados (Chl), musculatura somática (Mso) y cutícula (C) rodeado de Rxn inflamatoria. Miofibrillas (Mio).

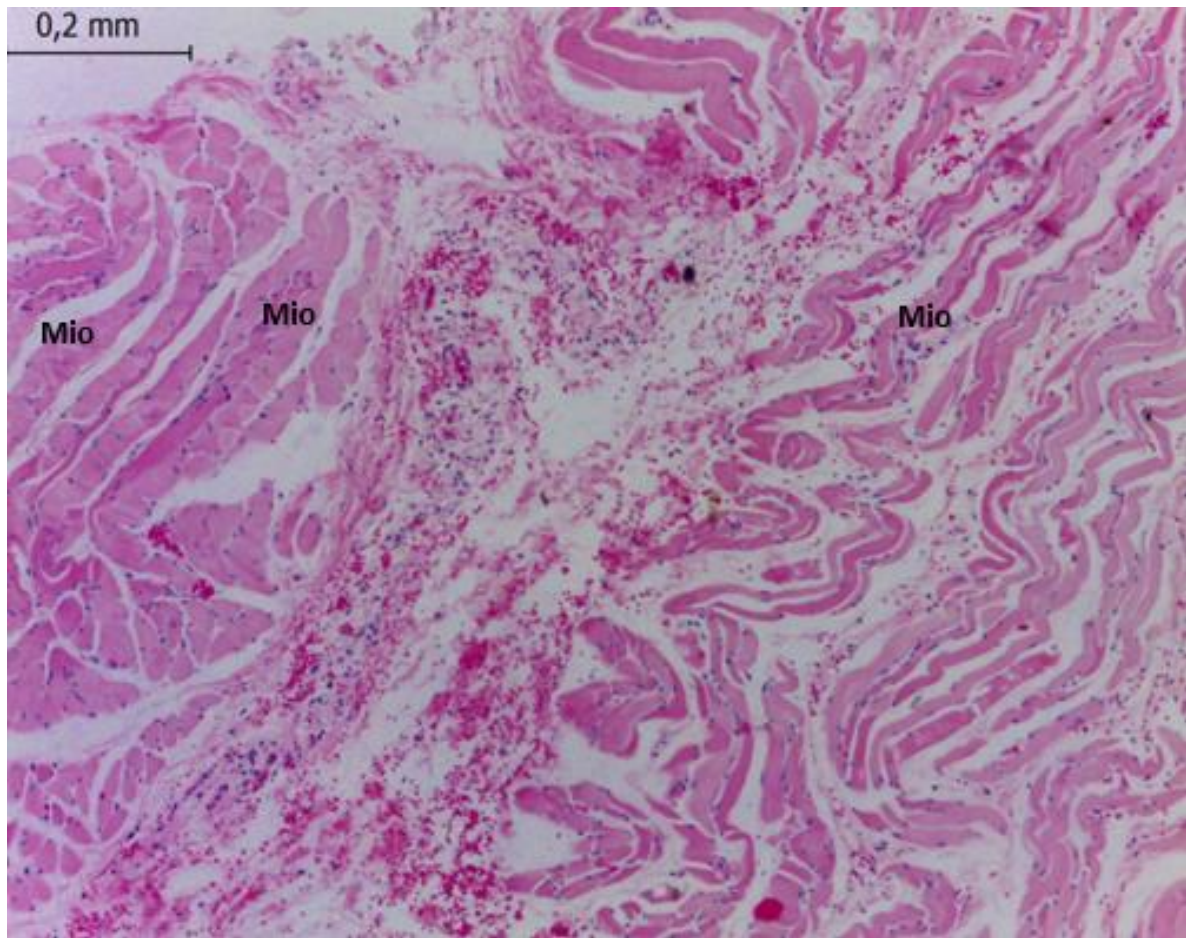


Fig. 38. Corte anterior a mayor aumento (magnificación x 40), se observa hemorragia, edema entre miofibrillas (Mio) y necrosis focal coagulativa (NI).

Intestino

Corte histológico del nódulo formado en la superficial intestinal

Se logra apreciar que el pseudoquiste se localiza en el mesenterio que rodea al intestino delgado originándose una paniculitis severa con gran cantidad de exudado mixto de tipo eosinofílico, basófilo y supurativo, con tendencia a una formación granulomatosa .

Cabe resaltar que se halló una necrosis no parasitaria licuefactiva bacteriana junto al nódulo formado por el parásito concluyéndose que éste, al atravesar el intestino, arrastró bacterias hacia el mesenterio, pudiéndose provocar una peritonitis (Fig. 40).

Si bien la larva se encontró fuera del intestino se observó lesión en el mismo órgano en la zona adyacente al nódulo, presentando una enteritis eosinofílica parasitaria multifocal. Además, se identificó infiltración eosinofílica en la lámina propia de las vellosidades intestinales, atrofia y un proceso de necrosis de los enterocitos donde se observaron signos morfológicos típicos: picnosis y cariorexis, así como necrosis coagulativa (Fig. 42). De igual modo, se muestra el desprendimiento y atrofia del epitelio de la mucosa (Fig. 43).



Fig. 39. Corte transversal del quiste embebido en el mesenterio que rodea al intestino de la rata infectada con larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -3h. Nótese elementos circulares que corresponden al parásito rodeado de severa reacción inflamatoria. Mucosa (M), vellosidades intestinales (ve), submucosa (s), capa muscular (Ms), serosa (Se) y mesenterio (Me).

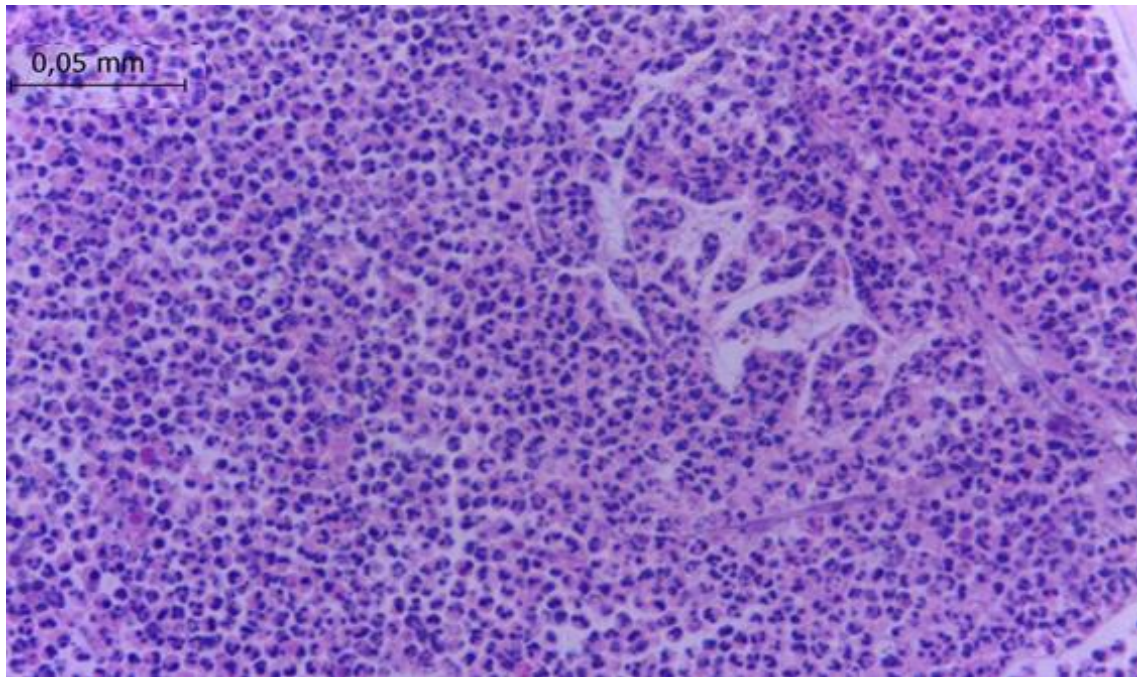


Fig. 40. Exudado tipo eosinofílico, basofílico y neutrofílico de lesión anterior.

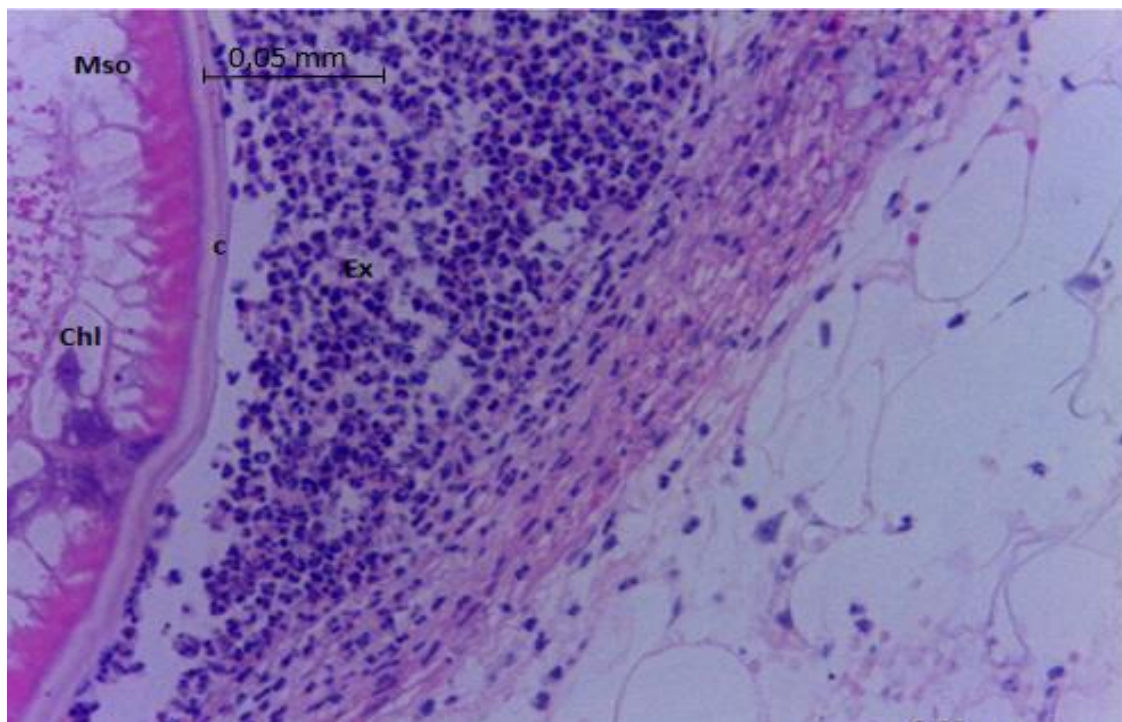


Fig. 41. Tendencia a formación granulomatosa rodeando la reacción inflamatoria (Ex) contigua al parásito pretratado con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -3h. Músculo somático (Mso), Cordones hipodermes (Chl), cutícula (c).

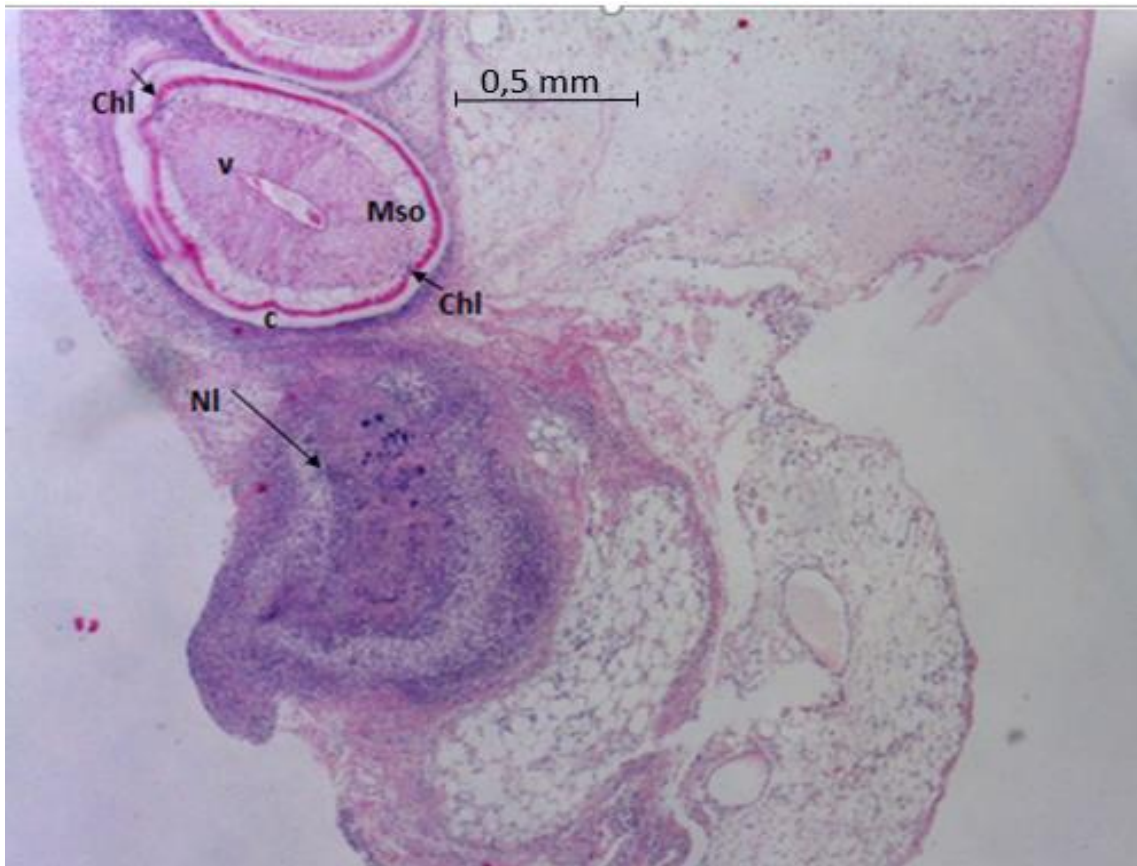


Fig. 42. Necrosis licuefactiva (NI) bacteriana contiguo al parásito. Cordones hipodermales laterales (Chl). Ventrículo (v). músculo somático (Mso)

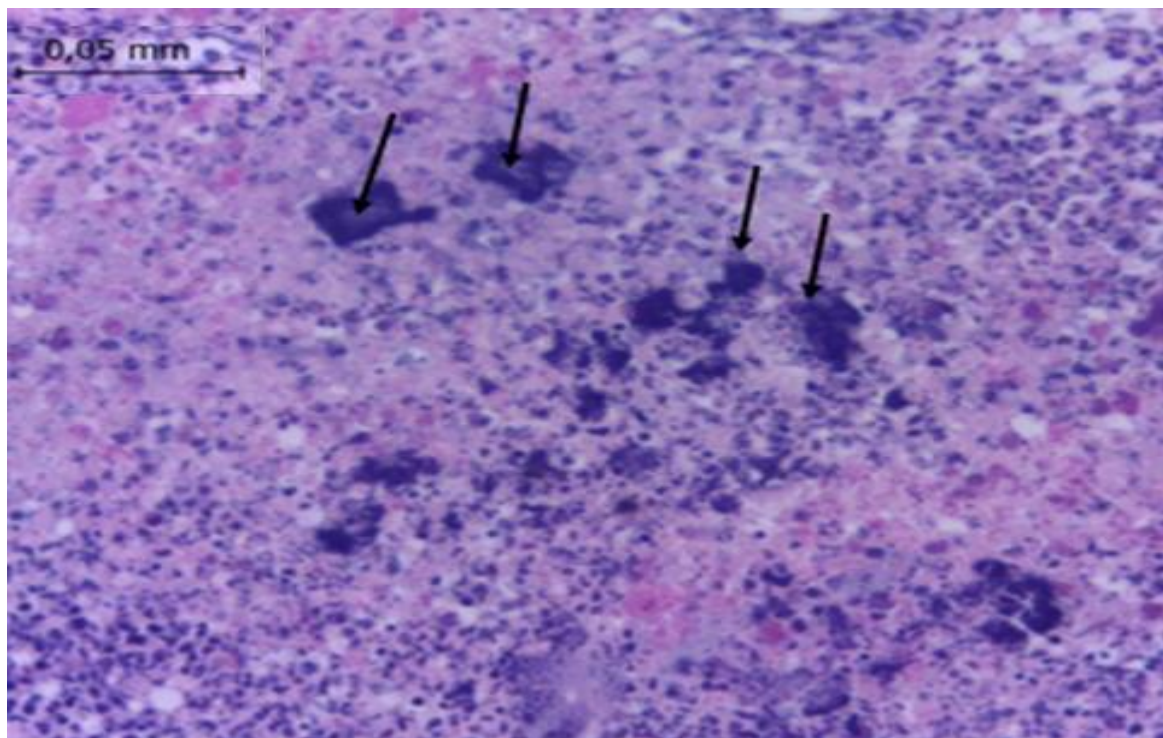


Fig. 43. Cúmulos de bacterias Gram positivas en exudado necrótico de lesión anterior (aumento x 100).

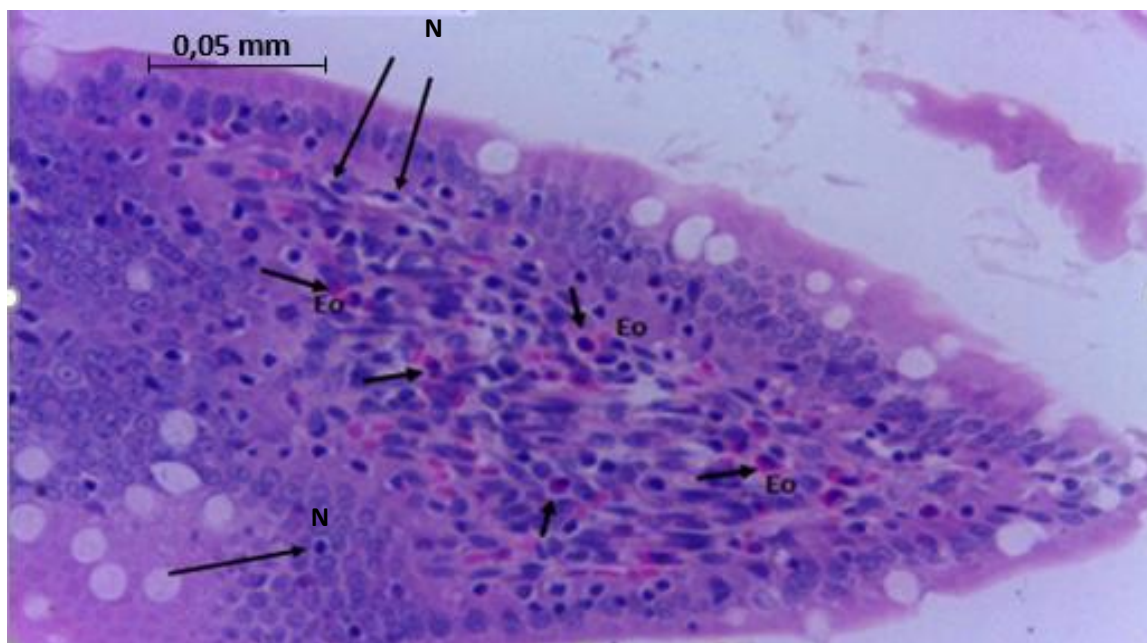


Fig. 44. Afectación en vellosidad intestinal de rata infectada con larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -3h. Se observa la infiltración eosinofílica (Eo) en la lámina propia y la necrosis de los núcleos de los enterocitos (N).

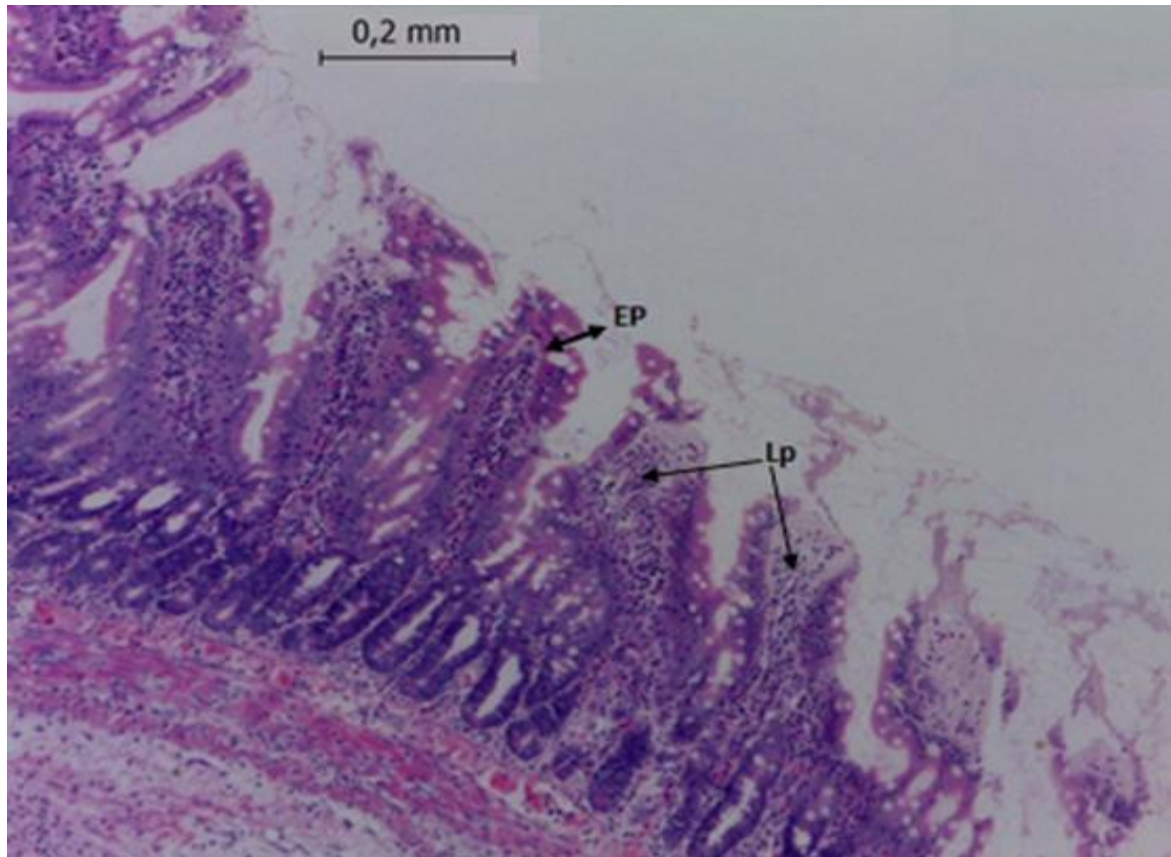


Fig. 45. Atrofia y desprendimiento de epitelio (EP) de la mucosa del intestino de rata infectada con larvas pretratadas con *A. sativum*, *C.limon* y *P. nigrum* -3h. . Lámina propia (Lp).

Omento mayor

Corte histológico del pseudoquiste en el tejido

Se observaron elementos circulares que corresponden a la larva ocasionando Paniculitis eosinofílica y supurativa con tendencia a una formación granulomatosa (Fig. 53); también se observó necrosis licuefactiva parasitaria (en la parte central hay un absceso rodeado de exudado inflamatorio) (Fig. 52).

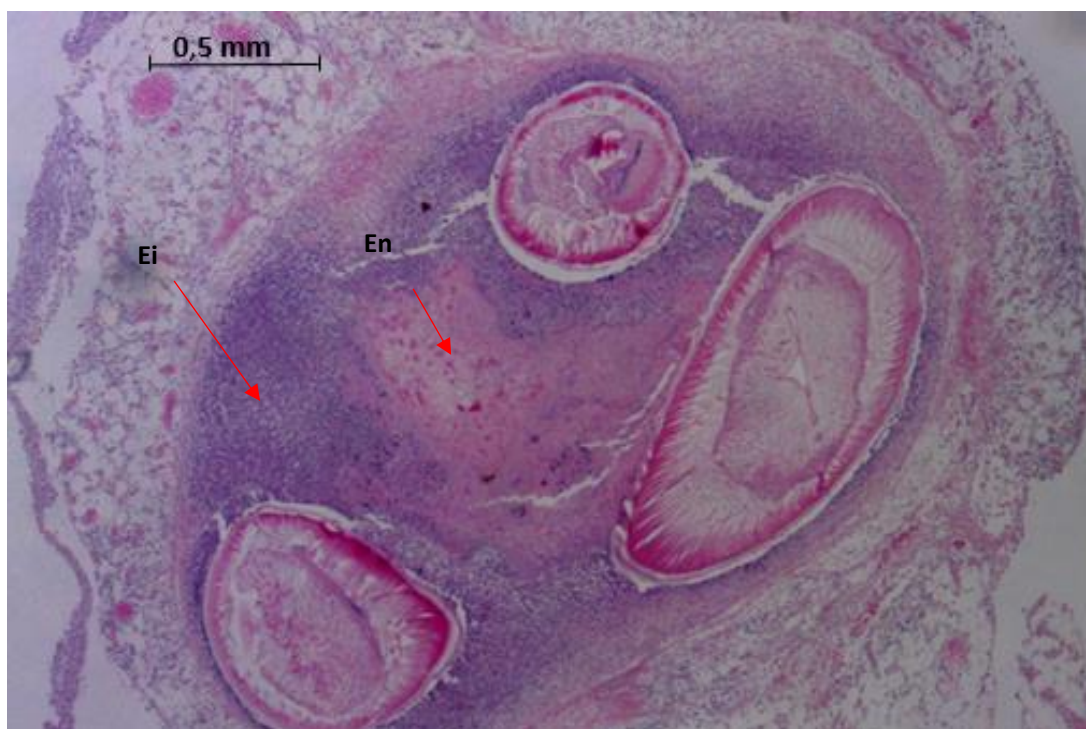


Fig. 46. Corte transversal del pseudoquiste en omento mayor de rata infectada con larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -1h constituido por exudado inflamatorio (Ei), exudado necrótico (En) y larvas.

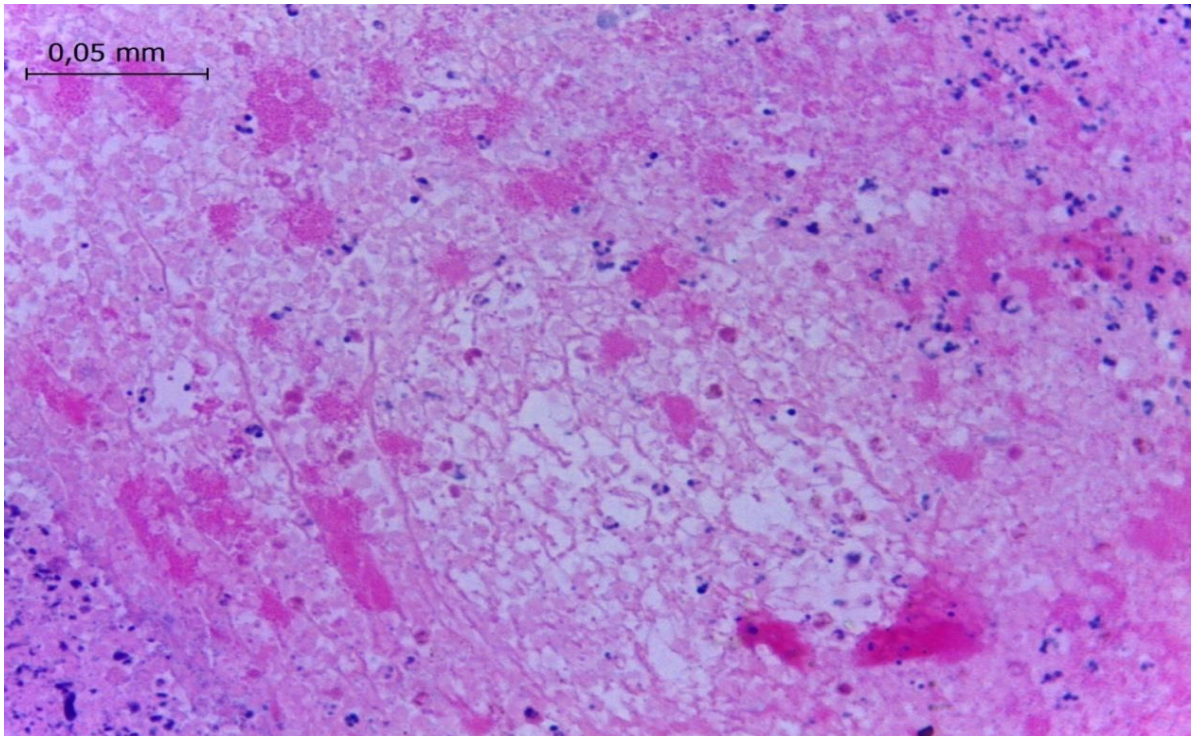


Fig. 47. Exudado necrótico licuefactiva a mayor aumento.

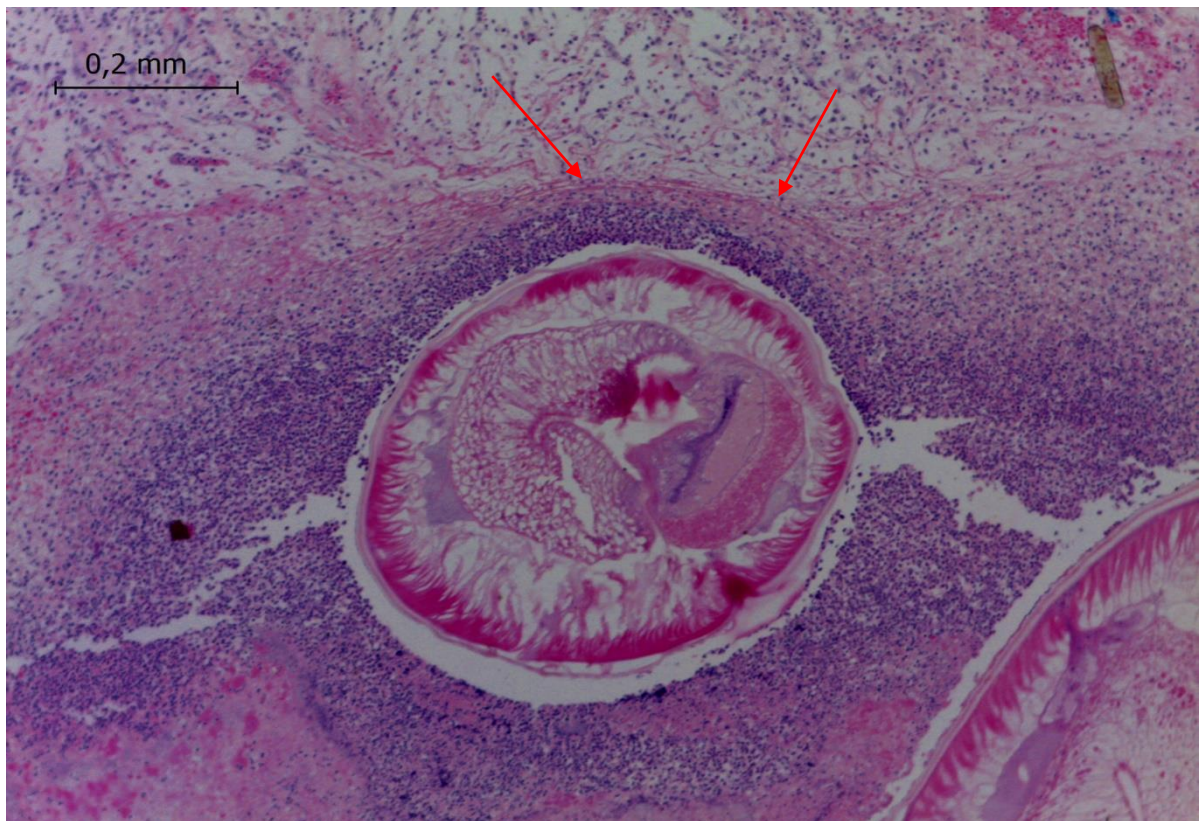


Fig. 48. Tendencia a formación granulomatosa de pseudoquiste formado por larva pretratada con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* -1h.

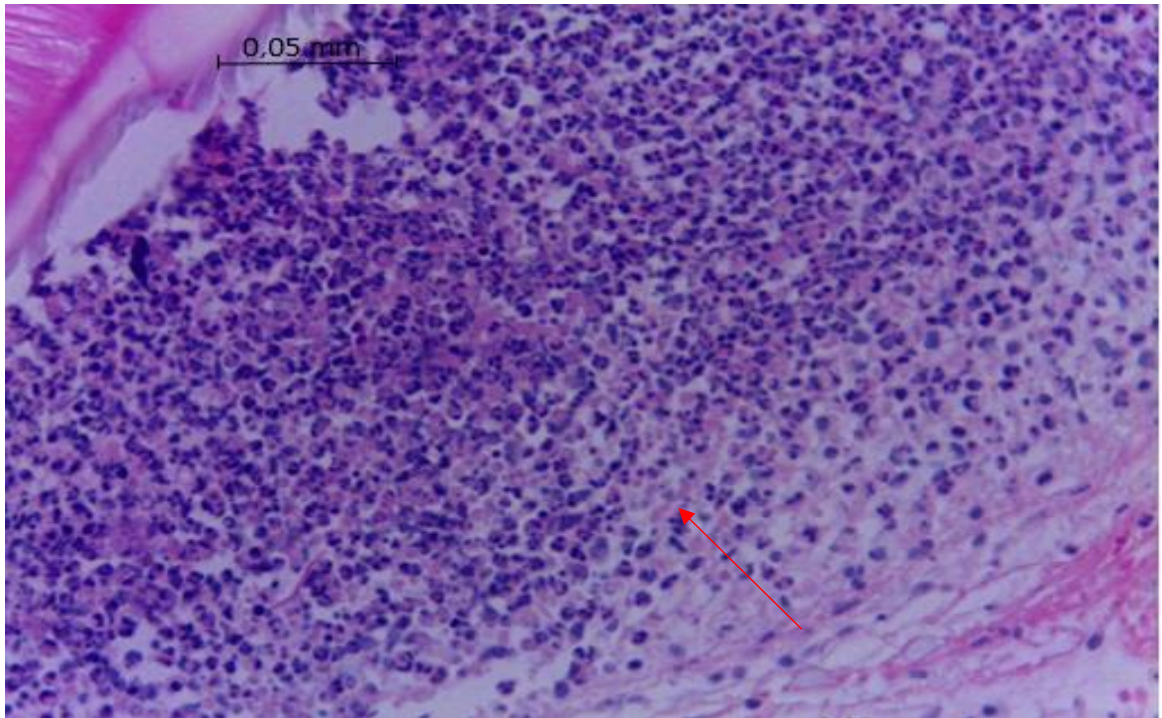


Fig. 49. Inflamación severa causada por larva pretratada con *A. sativum*, *C.limon* y *P.nigrum*- 1h a mayor aumento x 40.

Grupo IV
Larvas sin pre tratamiento (control)

Durante 1 y 3 horas

Las larvas L3 del grupo control, solo fueron expuestas a la sustancia placebo (solución salina 0.85%) a 1 y 3h, resultando que el 32% (24/75) y 36.7% (22/60) respectivamente, mostraron capacidad patógena. El 25.3% (19/75) y 30% (18/60) lograron sobrepasar el tracto gastrointestinal y alojarse en la cavidad abdominal. Mientras que el porcentaje restante, 6.7% (5/75) y 6.7% (4/60), produjeron lesión en el tracto digestivo y el tejido muscular.

Cavidad abdominal

El 42.2% (8/19) y 61.1% (11/18) de Las larvas que lograron migrar hacia la cavidad se incrustaron en la grasa abdominal, mesenterio y omento mayor; así también, el 5.2% (1/19) y 5.5% (1/18) formaron quistes sobre el omento mayor y el porcentaje restante, 52.6% (10/19) y 33.4% (6/18) se encontraron libres.

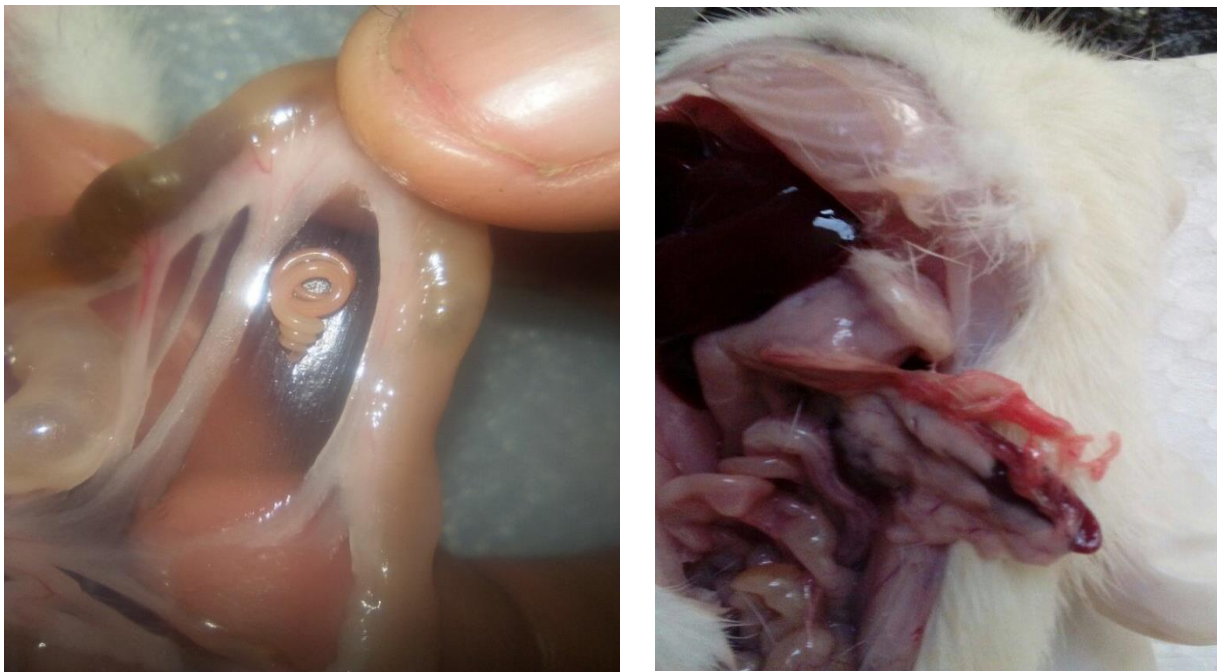


Fig. 50 . A-B Larvas no pretratadas con especies encontradas en la cavidad abdominal. (A) Incrustada en mesenterio (B) Nódulo en el omento mayor.

Estómago

El 2.7 % (2/75) y 3.3% (2/60) de las larvas causaron hemorragias en la parte glandular del estómago de 1.2 cm y lograron penetrar la pared gástrica.



Fig. 51. Lado luminal del estómago de la rata mostrando a la larva no pretratada anclada.

Intestino grueso

El 2.7 % (2/75) y el 1.7% (1/60) de las larvas, respectivamente, se incrustaron en el ciego observándose hemorragias de 1- 1.3 cm de longitud en la zona de lesión.

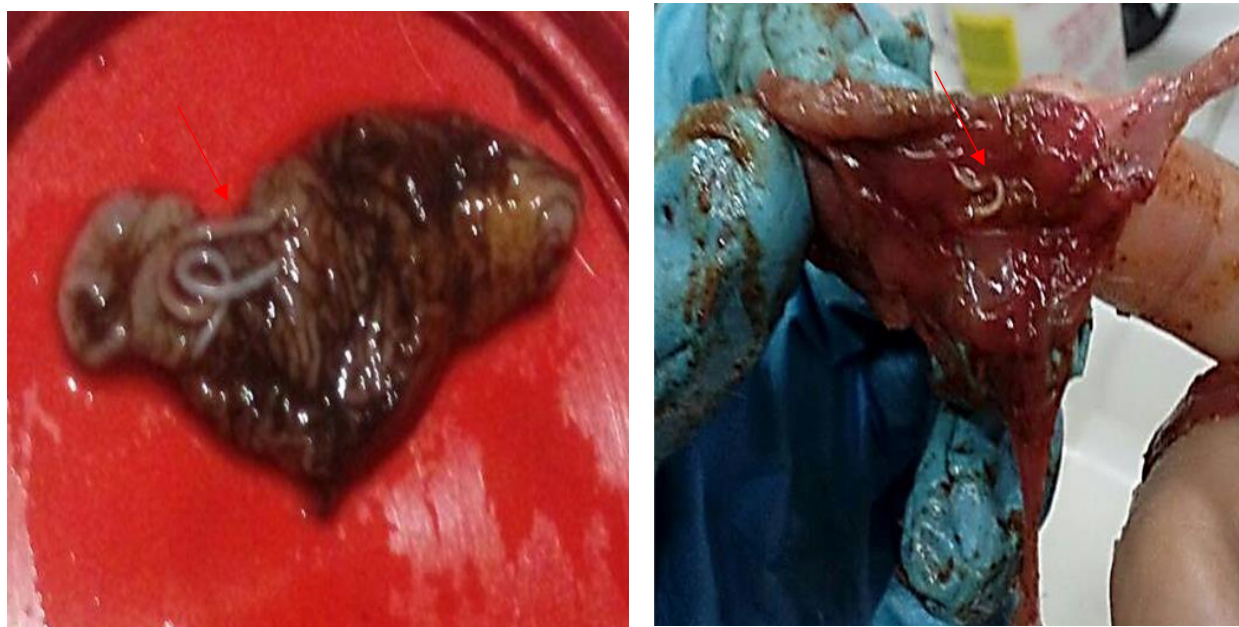


Fig. 52. Incrustaciones en el intestino grueso por larvas no pretratadas.

Músculo abdominal

El 1.3 % (1/75) y 1.7% (1/60) de las larvas restantes se incrustaron en el músculo abdominal dorsal.



Fig. 53. Incrustación al músculo de larva no pretratada.

Hallazgos histopatológicos en los órganos y tejidos afectados por las lavas control

Estómago

Corte histológico de la zona con mancha hemorrágica en el órgano

Se aprecia hemorragia de tipo focal y solución de continuidad en la capa muscular de la pared del estómago. Mostrando que la larva fue capaz de perforar el estómago. El segmento del parásito se encuentra dentro del estómago.

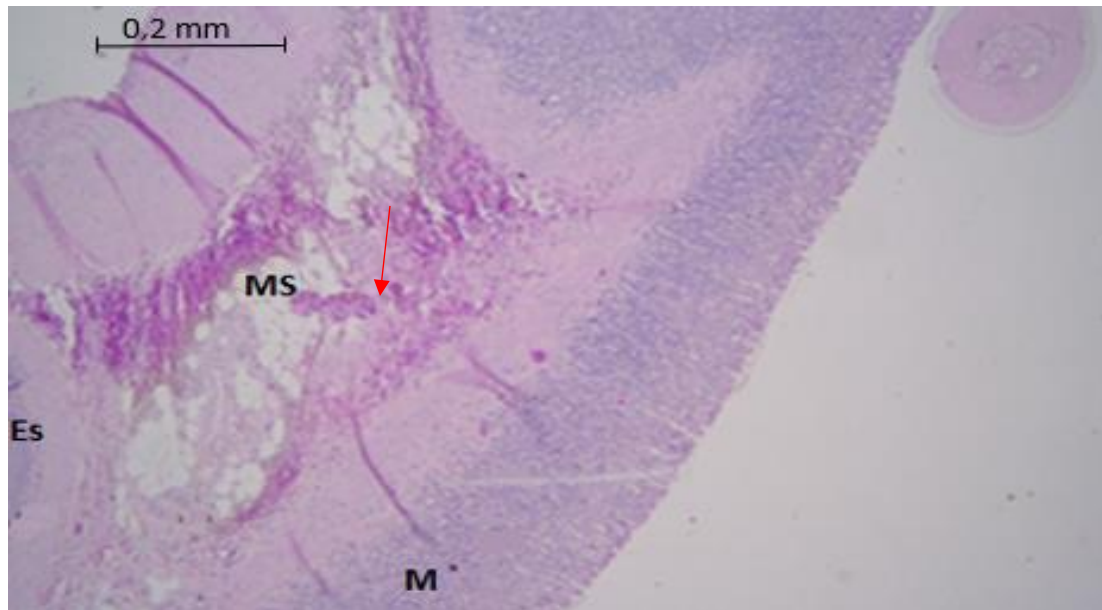


Fig. 54. Perforación de la capa muscular (Ms) del estómago de rata infectadas con larvas no pretratadas. Esófago (Es), mucosa (M).

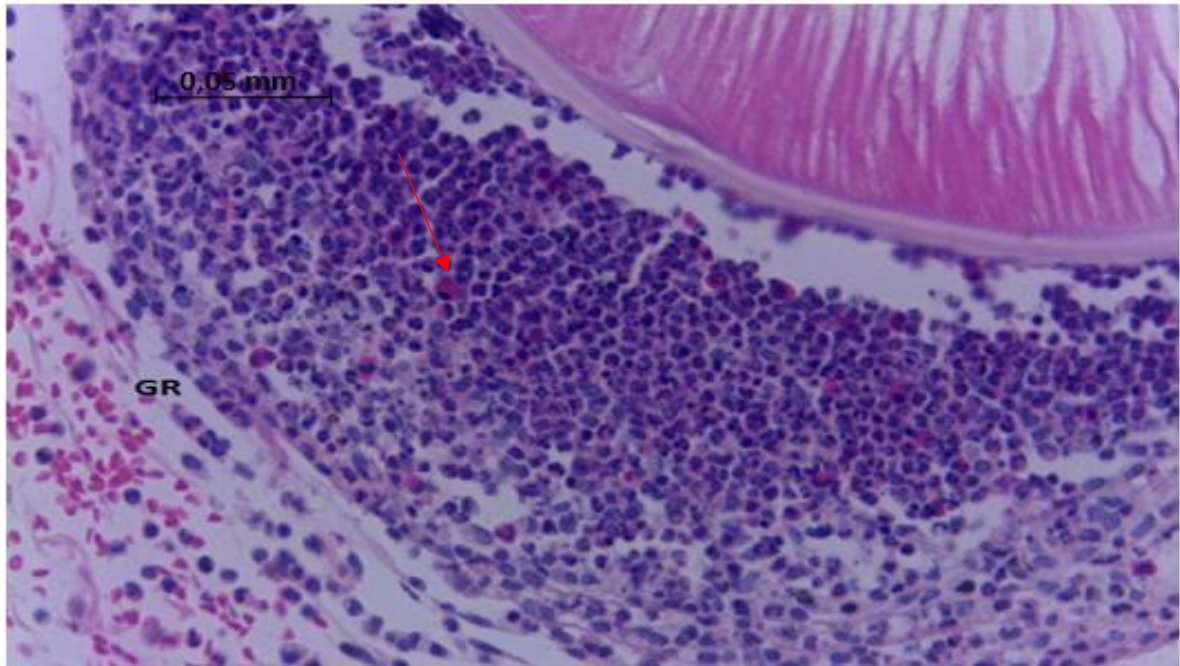
Intestino (ciego)

Corte histológico de la zona del ciego incrustada por la larva control

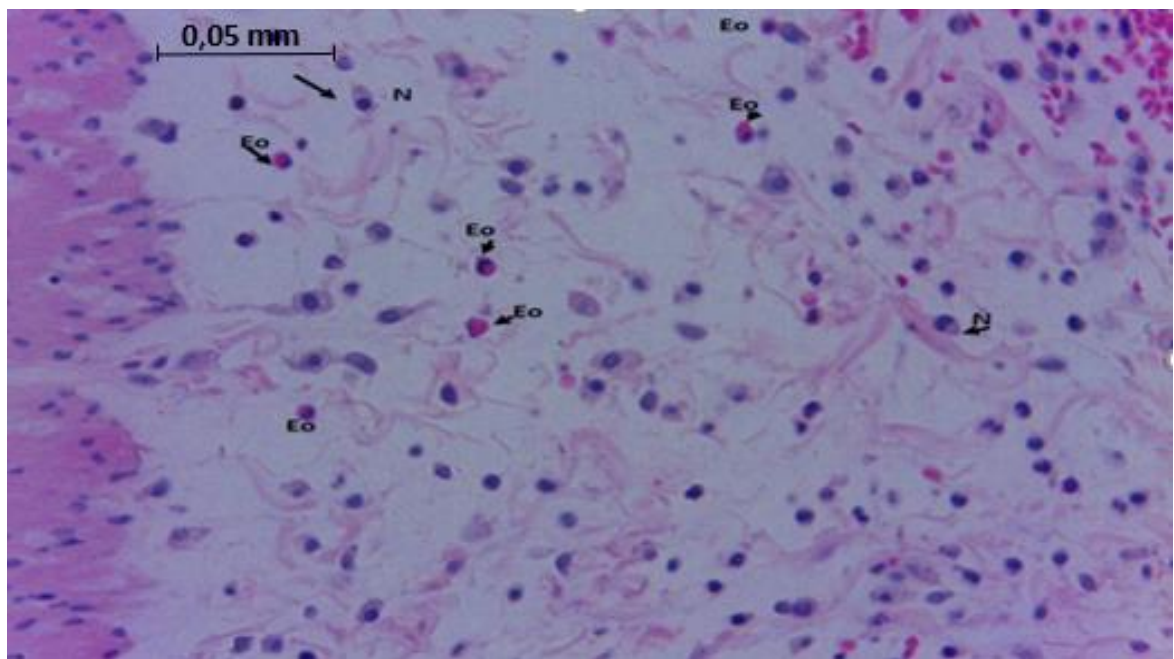
Se observa la invasión en la submucosa del ciego por parte del parásito (parte transversal a nivel paraventricular) ocasionándose una colitis con exudado supurativo y eosinofílico focal (Fig. 48). Igualmente se encontró en esta capa, edema intersticial con hemorragia difusa y la invasión de eosinófilos en la mucosa (Fig. 50).



Fig. 55. Corte transversal de la larva no pretratada a nivel del esófago paraventricular (Ep) invadiendo la submucosa (s). Se observa la musculatura polimiaria del cuerpo (Mso), los cordones hipodermes bilobulados (Chl) rodeada de inflamación.



A



B

Fig. 56. A- B Inflamación moderada rodeando al parásito sin pretratar. A. Glóbulos rojos signo de hemorragia. B. Células eosinofílicas (Eo) y neutrofílicas (N) en la submucosa (magnificación x 40).

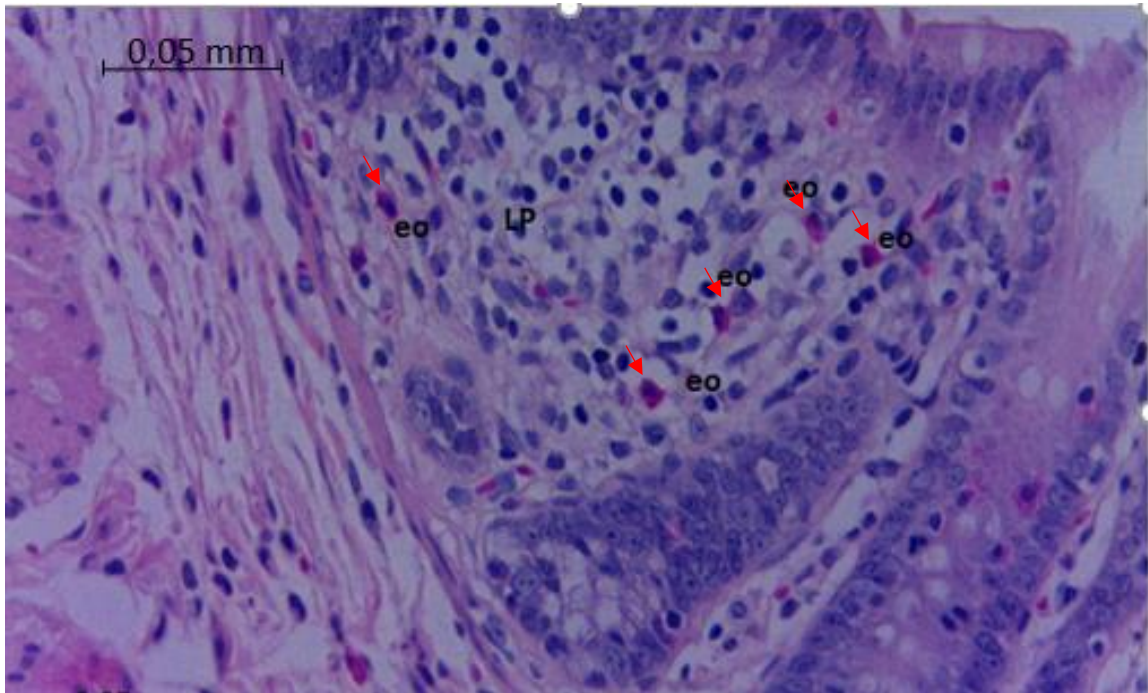


Fig. 57. Invasión de eosinófilos (Eo) en lámina propia (LP) de las vellosidades intestinales de la mucosa de rata infectada con larvas control.

Músculo abdominal

Corte histológico de la zona de anclamiento de larva control al tejido muscular

Se observa la parte glandular del esófago del parásito, no tratado con ninguna especia, causando una reacción inflamatoria eosinofílica (Rx); además, se evidenció necrosis coagulativa de las células musculares (Nc) que rodean al parásito.

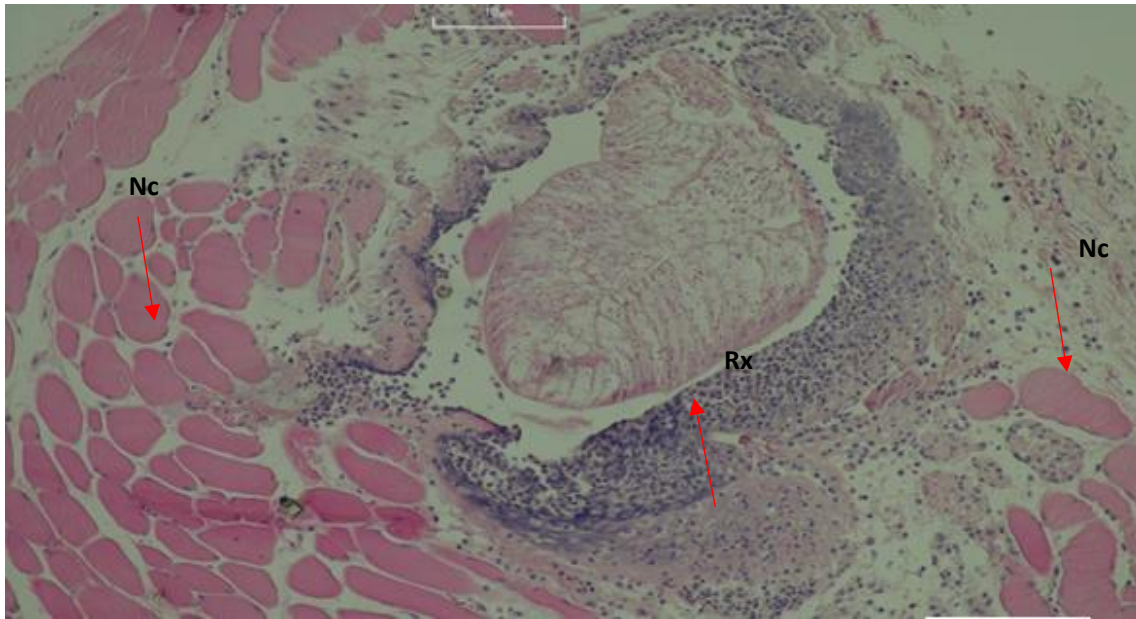


Fig. 58. Desplazamiento de la larva control a través de los paquetes musculares causando necrosis coagulativa e inflamación eosinofílica (Rx).

Mesenterio

Corte histológico de pseudoquiste hallado en el tejido

En el corte se muestran partes transversales del parásito causando inflamación severa.

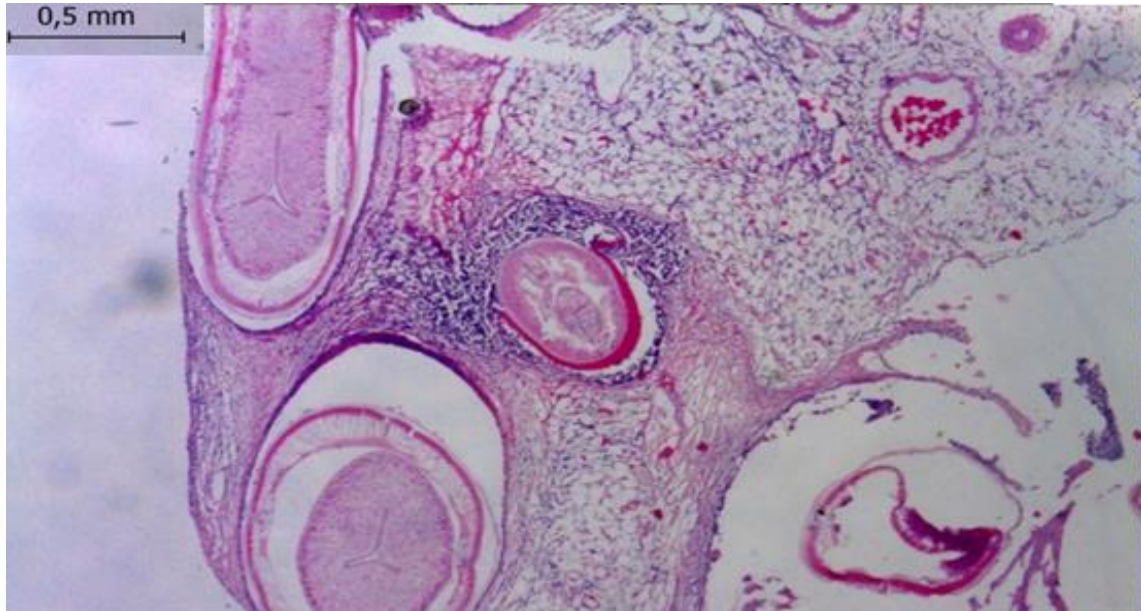


Fig. 59. Larva control rodeada de exudado inflamatorio.

Tabla 3. Distribución de larvas L3 morfotipo II patógenas tomando en cuenta el pretratamiento y tiempo sometido antes de la infección en ratas Wistar.

Grupo	Especies	Tiempo de sometimiento	Larvas patogenas en promedio tras las cinco replicas						Total de larvas patogenas	
			Cavidad abdominal			Estomago	Higado	Intestino		Musculo abdominal
			Libres	Incrustado o en la grasa abdominal mesenterio y omento mayor	Quistes en mesenterio, omento mayor y grasa abdominal					
GRUPO 1	RL		4.9% (3/61)	3.3% (2/61)	3.3% (2/61)	1.6% (1/61)	1.6% (1/61)	0% (0/61)	16.3% (10/61)	
GRUPO 2	L	1h	5.6% (3/54)	12.9% (7/54)	0% (0/54)	0% (0/54)	1.9% (1/54)	0% (0/54)	24.1% (13/54)	
GRUPO 3	A		4.6% (3/64)	7.8% (5/64)	7.8% (5/64)	0% (0/64)	1.6% (1/64)	0% (0/64)	23.4% (15/64)	
GRUPO 4	Control		13.3% (10/75)	10.7% (8/75)	1.3% (1/75)	2.7% (2/75)	0% (0/75)	2.7% (2/75)	32% (24/75)	
GRUPO 1	RL		5% (3/60)	0% (0/60)	0% (0/60)	1.7% (1/60)	1.7% (1/60)	0% (0/60)	8.4% (5/60)	
GRUPO 2	L	3h	2% (1/49)	4.1% (2/49)	0% (0/49)	2% (1/49)	0% (0/49)	0% (0/49)	12.2% (6/49)	
GRUPO 3	A		3% (2/66)	3% (2/66)	0% (0/66)	0% (0/66)	1.5% (1/66)	1.5% (1/66)	10.5% (7/66)	
GRUPO 4	Control		10% (6/60)	18.3% (11/60)	1.7% (1/60)	3.3% (2/60)	0% (0/60)	1.7% (1/60)	36.7% (22/60)	

6.3. DETERMINACION DEL EFECTO POSIBLE DE LOS FACTORES DE TRATAMIENTO Y TIEMPO SOBRE EL NÚMERO DE LARVAS 3 MORFOTIPO II DE *Anisakis* SPP. CON POTENCIAL PATÓGENO RESPECTO AL NÚMERO DE LARVAS INOCULADAS.

Mediante un diseño factorial 2 x 4 (2 factores y 4 niveles) se realizó el análisis de los datos aplicando el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con la finalidad de establecer si los factores (tiempo y tipo de pretratamiento de larvas) o la interacción tienen un impacto sobre nuestra variable respuesta (N° de larvas con potencial patógeno/ N° de larvas administradas).

ANOVA

Factor tratamiento de las larvas L3

Este factor produce un efecto significativo en el número de larvas con potencial patógeno con respecto al número de larvas administradas ($p=0.001$) y por tanto es un factor definitivo para generar variantes en la variable respuesta.

Factor tiempo de tratamiento de larvas L3

Este factor no tiene mayor influencia en la variable respuesta ($p=0.054$) (Tabla 4). Por consiguiente, cualquier tiempo de exposición de las larvas a 1 o 3h en cada tratamiento no afecta sobre nuestra variable respuesta.

Interacción de ambos factores

Se determinó que la interacción de estos dos factores en conjunto no influye en nuestra variable respuesta ($p=0.294$).

Tabla 4. Resultado del Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías que se obtuvieron aplicando el programa estadístico Minitab versión 18.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0.37191	0.05313	4.22	0.002
Lineal	4	0.32310	0.08078	6.42	0.001
tiempo	1	0.05041	0.05041	4.01	0.054
tratamientos	3	0.27269	0.09090	7.22	0.001
Interacciones de 2 términos	3	0.04881	0.01627	1.29	0.294
tiempo*tratamientos	3	0.04881	0.01627	1.29	0.294
Error	32	0.40260	0.01258		
Total	39	0.77451			

Prueba de Tukey (Tabla A6.1)

Siendo el factor “tratamiento” significativo para generar un cambio sobre el N° de larvas con potencial patógeno con respecto al N° de larvas administradas, el método de Tukey nos permitió determinar qué tipo de tratamiento, incluido el control generaba diferencias significativas entre las medias de la variable respuesta.

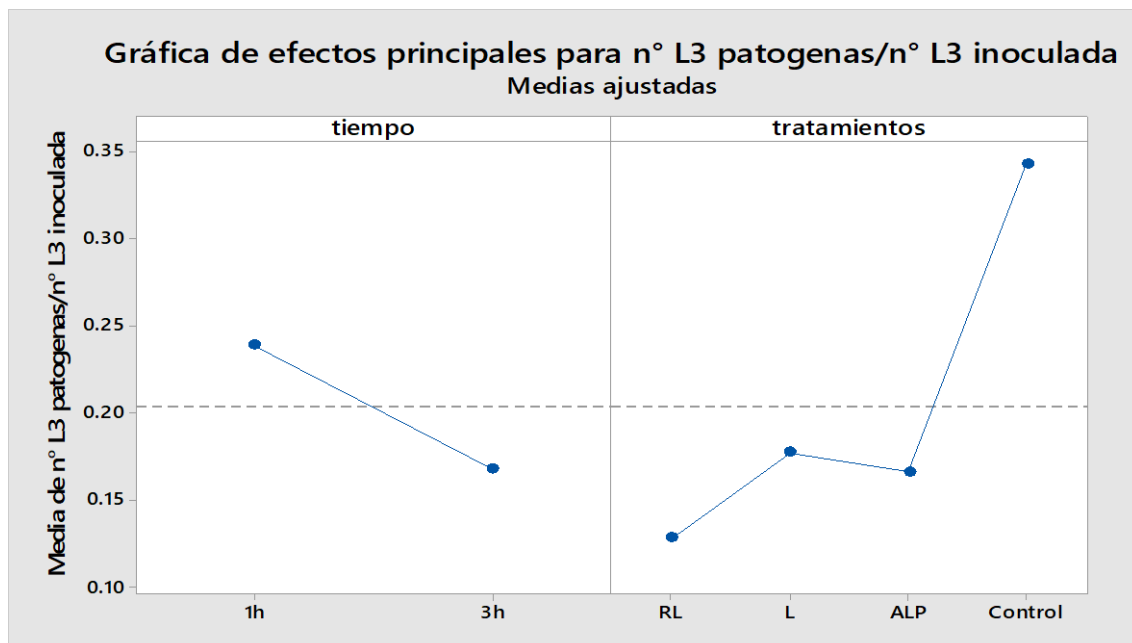
Los resultados demostraron que los tres tratamientos (T1: *C. pubescens* y *C. limon*, T2 : *C. limon* y T3: *A.sativum*, *C. limon* y *P.nigrum*) dieron un efecto similar ya que sus medias son muy parecidas no existiendo diferencia significativa entre el N° de larvas con potencial patógeno respecto del número de larvas administradas; sin embargo, comparando estos tratamientos con el control, existe una diferencia significativa ya que sus medias son muy diferentes, por tanto, cualquier tratamiento genera un cambio de igual significancia en la variables respuesta.

Análisis de gráfica de efectos principales

Según la Gráfica 1, el tiempo parece afectar la tasa media del N° de larvas con potencial patógeno sobre el número de larvas administradas, las larvas que se sometieron durante 3h en los diferentes tratamientos antes de su inoculación tienden a atravesar menos a diferencia de

las que se expusieron a 1 h; sin embargo, no resulta significativo como se vio en la prueba de análisis de varianza.

También se observa en esta grafica que la variable respuesta del grupo de ratas inoculadas con larvas pre tratadas con *C. pubescens* y *C. limon* (RL) es el más bajo a diferencia de los otros tratamientos; no obstante, como muestra la Prueba de Tukey, estadísticamente no existe diferencia significativa entre los tres tipos de tratamientos, por lo tanto no se puede concluir que el “rocoto con limón” tengan un mayor efecto para lograr una variación en el número de larvas patógenas.



Grafica 1. Efectos principales en la variable respuesta.

VII.

VII. DISCUSIÓN

Las anisakiasis es una zoonosis parasitaria donde el principal agente causal es el morfotipo I de *Anisakis* spp. En el Perú no se han reportado casos recientes desde el último mostrado en 1999 (Barriga y Salazar, 1999); sin embargo, en el mundo se acrecienta (Shimamura, Muwanwella, Chandran, Kandel y Marcon, 2016). Esto se produce debido a los hábitos culinarios que van cambiando (Guardone *et al.*, 2018). En Japón y los países del lejano oriente principalmente se presenta la mayor cantidad de casos debido al consumo masivo del pescado crudo. En nuestro país, el “ceviche” es el principal vehículo para adquirir esta enfermedad, más aún si los peces de nuestra costa peruana de consumo frecuente presentan una alta prevalencia de *Anisakis* spp. morfotipo II.

Las larvas L3 morfotipo II de *Anisakis* spp. analizadas en *S. chiliensis chiliensis* presentan una prevalencia de 47.5 % comparada con en el trabajo de Cabrera y Altamirano (2004) que muestra un porcentaje de 24.3% siendo una prevalencia mucho menor a la reportada en este estudio; además, se observa que este porcentaje encontrado sigue siendo significativamente más alta que la prevalencia del morfotipo I en los diferentes peces marinos (caballa, perico y jurel) que solo varía entre 4 y 8%.

En un estudio experimental con ratas se señala que el 7.1% de las larvas morfotipo II, aisladas de bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) de las costas de la península ibérica, penetraron solo a nivel del estómago y migraron hacia a la cavidad encontrándose libres 4 h post-inoculación (Romero *et al.*, 2014); sin embargo, en el presente trabajo, se hizo un pretratamiento a las larvas antes de la infección y se dejó a la larva por 48h dentro del modelo murino para determinar si la larva morfotipo II tuviera la capacidad de migrar y dañar los diferentes órganos o simplemente muere a las pocas horas post inoculación. Este tiempo (48 h) se determinó ya que los síntomas de la anisakiasis aparecen tras un periodo de latencia que varía de 1- 48h post ingesta del pescado (Repiso *et al.*, 2013), por lo que, se llegó a demostrar que la larva morfotipo II de *Anisakis* spp. presenta vasta capacidad de afectar un mayor número de órganos a pesar de ser sometidas a un pretratamiento con ingredientes utilizados en la preparación del ceviche. Así mismo, se observó el mismo patrón patológico en las ratas control infectadas con larvas sin tratamiento.

Los casos de anisakiasis en humanos son mayormente producidos en el estómago (anisakiasis gástrica) seguidamente de la anisakiasis intestinal y muy inusual de las anisakiasis ectópicas (extra gastrointestinal) (Guardone *et al.*, 2018). En Japón se presenta la anisakiasis gástrica en su mayoría mientras que en Europa (Italia y España) prevalece la anisakiasis intestinal siendo la forma crónica la más común (Montalto *et al.*, 2005; Repiso *et al.*, 2013). En nuestro modelo experimental la

localización más frecuente fue la extra gastrointestinal (anisakiasis ectópica) encontrándose en el hígado, músculo esquelético y en la cavidad abdominal formando nódulos en el mesenterio y omento mayor. Seguidamente fue la anisakiasis gastrointestinal, donde concretamente la afectación fue ligeramente mayor en el intestino que en el estómago. Probablemente las localizaciones de las larvas encontradas fuera del tracto digestivo se deban al tiempo de permanencia en el hospedero e incluso a este nivel ectópico se observó un cuadro patológico importante.

En las larvas pre tratadas con *C. pubescens* y *C. limon* se observó cierta pérdida de patogenicidad, al someterlas más tiempo (3h) a la acción de estas especies. Durante 1h lesionaron el estómago, intestino delgado e hígado en el modelo murino donde la mayor parte de larvas se localizó en la cavidad abdominal incrustada o formando nódulos y otras migraron hacia el hígado; mientras que, cuando se sometieron durante 3 h se observó que produce daño solo en el tracto gastrointestinal; sin embargo, no se formaron nódulos ni incrustaciones ni hubo posterior migración hacia el hígado; pero, como se observa la capacidad patógena siguió presente. Al igual como se contempló en las larvas tratadas con solo *C. limón*, la mezcla de *A. sativum*, *P. nigrum* y *C. limon*, así mismo en las larvas sin tratamiento. Esto demuestra que el tiempo de pretratamiento no afectó la capacidad patógena observándose una amplia distribución de afectación en el modelo murino.

En esta investigación, se demostró lesiones histopatológicas en todos los órganos de las ratas infectadas con las larvas tratadas y sin pretratar. Las lesiones que se encontraron en el tracto gastrointestinal del modelo murino son similares a los distintos casos reportados de anisakiasis humana producidas por *Anisakis* spp. tipo I (Pampligione *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2014) en los que se menciona que frecuentemente se caracteriza por un infiltrado con predominio de eosinófilos formando microabscesos alrededor de la larva, pudiéndose ubicar desde la subserosa hasta la capa mucosa observándose en el interior exudado necrótico, fibrinoide y con presencia de eosinófilos y neutrófilos; así también, edema intersticial, hemorragias y los cambios histológicos más agudos se observaron en el tejido alrededor de la larva.

A diferencia de lo anteriormente mencionado, en nuestro estudio se demostró nuevos hallazgos histopatológicos, así como:

En el estómago, se observó atrofia severa en la capa muscular (Fig. 30), lisis en la vellosidad del epitelio de la mucosa producto de la acción mecánica de las larvas pretratadas con *C. limon*, además se halló una solución de continuidad en la capa muscular (Fig. 54) del estómago de ratas infectadas con larvas control y la aparición temprana de la formación granulomatosa (Fig. 10) con

larvas del grupo I con su posible curso hacia la cronicidad induciendo a la formación de nódulos (tumores).

El tracto intestinal es el que severamente se vio afectado, notándose pérdida de arquitectura de la capa mucosa (Fig. 26), muscular y desprendimiento del epitelio (Fig. 45). Así mismo, se contempló una tendencia granulomatosa (Fig. 41) en las ratas infectadas con larvas del grupo III y una necrosis no parasitaria licuefactiva bacteriana (Fig. 42) en el mesenterio contiguo al nódulo ubicado en la superficie del intestino formado por larvas pretratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum*, por lo que, se puede deducir que esta lesión es producto de la perforación del intestino, pudiendo traer como consecuencia una peritonitis. Los casos de anisakiasis intestinal pueden evolucionar a complicaciones más graves, desde una dilatación del intestino a una obstrucción intestinal que rápidamente se puede tratar con medicación conservadora (Repiso *et al.*, 2013); sin embargo, esta obstrucción puede llegar a un compromiso vascular, luego a un necrosamiento, perforación y a una peritonitis como se produjo en nuestro modelo utilizado en este estudio y progresar hasta una septicemia (Torrente *et al.*, 2015; Shweiki *et al.*, 2017).

En cuanto al hígado y músculo se observaron necrosis coagulativa, en el tejido mesentérico y epiplón se vio nuevamente la tendencia granulomatosa de los abscesos y al centro exudado necrótico licuefactivo parasitario (Fig. 48).

Estas lesiones histopatológicas y sus nuevos hallazgos es un aspecto indicativo de patogenicidad por parte del morfotipo II de *Anisakis* spp. presentando el mismo nivel de patología que el morfotipo I (Pampiglione *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2014); por lo tanto, es importante no desestimarlos como agente etiológico potencial de la anisakiasis.

Con relación a los resultados estadísticos (Anova) se observó que el número de larvas con potencial patógeno se ve afectada por el pre tratamiento con las especias ($p=0.001$). Con la Prueba de Tukey se determinó que la media de las larvas con potencial patógeno del grupo control tiende a ser mayor que con los otros tratamientos, de tal manera se concluye que existe diferencia significativa al agregar cualquier especias del ceviche empleado en este estudio (limón, rocoto, ajos, pimienta) variando en la cantidad de larvas. Sin embargo, los tres tratamientos tienen la misma influencia en la variable respuesta.

Cabe recalcar que en la gráfica 1 se observa que las ratas inoculadas con larvas tratadas con *C. pubescens* y *C. limon* (RL), presentan el número más bajo de larvas con potencial patógeno; no obstante, este tratamiento no es significativo según la Prueba de Tukey. Es posible que si la concentración fuera mayor a la empleada el resultado podría variar.

Por lo tanto, estadísticamente existe diferencia significativa en el N° de larvas con potencial patógeno al incorporar cierta especie del ceviche de tal modo que esta se altera ; sin embargo, ante la patología y hallazgos descubiertos en el grupo control, así como en los demás grupos, es importante no subvalorar la capacidad patógena de las larvas de *Anisakis* spp. morfotipo II obtenida de *S. chiliensis chiliensis*.

El presente trabajo es uno de los primeros en estudiar a fondo la capacidad patógena de las larvas de *Anisakis* spp. tipo II previamente tratadas con diferentes especias que se emplean en el ceviche, tanto en América como en otros lugares del mundo.

VIII. CONCLUSIONES

- La prevalencia de larvas L3 morfotipo II de *Anisakis* spp. en *S. chiliensis chiliensis* (47,50%) fue superior a la reportada en años anteriores (1997) y predominante en cuanto a la presencia del morfotipo I en peces de nuestra costa.
- Se demostró que las larvas 3 morfotipo II de *Anisakis* spp. tratadas con especias utilizadas en la preparación del ceviche durante 1 y 3h presentaron capacidad patógena en el modelo murino al atravesar los tejidos y causar lesiones a lo largo del tracto gastrointestinal y migrar hacia otros órganos.
- Se observó que la larva de *Anisakis* spp. morfotipo II a las 48 h post infección produce mayormente anisakiasis extra gastrointestinal, encontrándose libres, incrustadas o formando nódulos en el mesenterio, epiplón y grasa abdominal. Así mismo, causaron anisakiasis gastrointestinal siendo el intestino el más afectado.
- Los nuevos hallazgos histopatológicos encontrados en los tejidos de la rata como la temprana reacción granulomatosa, atrofia y necrosis licuefactiva bacteriana, son indicativos de la patogenicidad que puede provocar el morfotipo II de *Anisakis* spp.
- Se determinó que el factor pretratamiento con las especias (*C. limón*, *C. pubescens*, *A. sativum* y *P. nigrum*) utilizadas en el ceviche, mas no el tiempo de sometimiento a estas causa una variación en el número de larvas con potencial patógeno.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIZONO, N., YAMADA, M., TEGOSHI, T, Y YOSHIKAWA., M. *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, vol. N° 9, 6, p 517–521.
- ASATO, R., WAKUDA, M., Y SUIYOSHI, T. A case of human infection with *Anisakis physeteris* larvae in Okinawa, Japan. *Jpn J Parasitol*, 1991, vol. 40, N° 2, p 181-183.
- BARON, L., BRANCA, G., TROMBERRA, C., PUNZO, E., QUARTO, F., SPECIALE, G., Y BARRESI V. Intestinal anisakidosis: Histopathological findings and differential diagnosis. *ELSEVIER*, 2014, vol. 210, N° 11, p746-750.
- BARRIGA, J Y SALAZAR, F. Anisakiasis: Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 1999, vol. 19, N° 4, p 317-323.
- BERLAN, B. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Journal Sarsia*, 1961, vol. 2, N° 1, p 50.
- CABRERA, R Y SUAREZ, L. Probable emergencia de anisakiosis por *Anisakis physeteris* durante el fenómeno “El Niño” 1997-1998 en la costa peruana. *Parasitol latinoam*, 2002, vol. 57, N°3-4, p 166-170.
- CABRERA, R., TANTALEÁN, M., Y CHAVERA, A. Patogenicidad de las larvas de *Anisakis physeteris* inoculadas experimentalmente en *Canis familiaris*. *Parasitol al día*, 1997, vol. 21, N° 1-2, p14-19.
- CABRERA, R., Y TRILLO ALTAMIRANO, MDP. Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Rev Gastroenterol*, 2004, vol. 24, N° 4, p 335-342.
- CLAVEL, A., DELGADO, B., SANCHEZ-ACEDO, C., CARBONELL, E., CASTILLO, J., RAMÍREZ, J., QUÍLEZ, J., GÓMEZ LUS, R., Y KAGEI, N. A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Jpn J Parasitol*, 1992, vol. 42, N° 3, p 445-448.
- Cultura latina. *Ceviche [en línea]* [fecha de consulta: diciembre 15 del 2018]. Disponible en: <https://www.culturalatina.at/es/service-2/culinaria/item/18-ceviche>.

- DE LIBERATO, C., BOSSU, T., SCARAMOZZINO, P., NICOLINI, G., CEDDIA, P., MALLOZZI, S., CAVALLERO, S Y D'AMELIO, S. Presence of Anisakid Larvae in the European Anchovy, *Engraulis encrasicolus*, Fished Off the Tyrrhenian Coast of Central Italy. *Journal of Food Protection*, 2013, vol. 76, N° 9, p 1643- 1648.

- DONG BAEK KANG, M.D., JUNG TAEK OH, M.D., WON CHEOL PARK, M.D., AND JEONG KYUN LEE, M.D. Small Bowel Obstruction Caused by Acute Invasive Enteric Anisakiasis. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 2010, vol. 56, N° 3, p 192-195.

- GARCÍA, J., RODRÍGUEZ, R., BALLESTERO, A., ZULOAGA, J., FERNANDEZ, B., ARIAS, J Y CABALLERO, M. Previous Exposure to the Fish Parasite Anisakis as a Potential Risk Factor for Gastric or Colon Adenocarcinoma. *Medicine*, 2015, vol. 94, N° 40, p 1-7.

- GIARRATANA, F., GIUFFRIDA A., GALLO, F., ZIINO, G., Y PANEBIANCO, A. Study of the Resistance Variability of *Anisakis* Larvae to Some Technological Stressors. En A. (ed) Pugliese, A. Gaiti, & G. Boiti, *Veterinary Science. Current Aspects in Biology, Animal Pathology, Clinic and Food Hygiene*, 2010, vol. 26, p 155-160.

- GUARDONE, L., ARMAN, I A., NUCERA, D., COSTANZO, F., MATTIUCCI, S., Y BRUSCHI F. Human anisakiasis in Italy: a retrospective epidemiological study over two decades. *Parasite*, 2018, vol. 25, N° 41, p 1-21.

- HUMASON, G. Animal Tissue Techniques. *W.H. Freeman*, 1979, vol. 4, N° 1. p 53.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA (INEI). Perú - Encuesta Nacional de Hogares sobre Condiciones de Vida y Pobreza 2017. (NUMERO DE ID-001-PER-INEI-ENAH0-2017).
https://webinei.inei.gob.pe/anda_inei/index.php/catalog/613/variable/V4064.

- ISHIKURA, H., KIKUCHI, K., NAGASAWA, K., OIWA, T., TAKAMIYA, H., SATO, N., Y SUGANE, K. Anisakidae and anisakidosis. *Prog Clin Parasitol*, 1992, vol. 3, N° 43, p 102.

- IWASAKI, K Y TORISU M. Anisakis and eosinophil phlegmon experimentally induced in normal rabbits by parasited derived eosinophil chemotactic factor. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1982, vol. 23, N°3, p 593-60.

- JEONG S. L., BONG S. K., SEUNG H. K., JI K. P., GUKMYUNG C., IM K. H., SUN Y. J, CHANG L. H., HYUN J. S. Y YOUNG B. C. Acute invasive small-bowel Anisakiasis: clinical and CT findings in 19 patients. *Abdom Imaging*, 2014, vol. 39, N° 3, 452-458.

- LÓPEZ, D., RAMÍREZ, L., DEL ROSAL PALOMEQUE, R., LÓPEZ, F., FERNÁNDEZ R., Y FUGAROLAS, M. Anisakiasis en España: una enfermedad creciente. Revisión. *ELSEVIER*, 2003, vol. 23, N° 6, p 307-311.

- KAGEI, N., SANO, M., TAKAHASHI., TAMURA, Y; Y SAKAMOTO, M. A case of acute abdominal syndrome caused by *Anisakis* type-II larva. *Jpn. J. Parasitol*, 1978, vol. 27, N° 5, p427-431.

- MIZURA, N., OKUMURA, S., TSUCHIHASHI, H., OGAWA, M Y KAWASAKI, M. A Second Attack of *Anisakis*: Intestinal Anisakiasis Following Gastric Anisakiasis. *ACG Case Reports Journal*, 2018, vol. 5, p 1-4.

- MONTALVO, M., MIELE, L., MARCHEGGIANO, A., SANTORO, L., CURIGLIANO, V., VASTOLA, M., Y GASBARRINI, G. *Anisakis* infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohns disease and eosinophilic gastroenteritis. *Digestive and Liver Diseases*, 2005, vol. 37, N°1, p 62-64.

- NAVARRO, J., RÁMIREZ, R Y VILLAGRÁN, C. *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. 1era ed. México: Samsara, 2012. 159 p. ISBN 978-970-94-2830-8.

- PATIÑO, J Y OLIVERA, M. Anisakiasis gastro-alérgica, primera descripción de un caso en Colombia y revisión bibliográfica. *Biomedica*, 2019, vol. 39, p 241-246.

- REPISO, A., ALCANTARA, M., GONZÁLEZ, C., DE ARTAZA, T.,. RODRÍGUEZ, R., VALLE, J Y MÁRTINEZ, J. Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes, *Gastroenterol Hepatol*, 2003, vol. 26, N° 6, p 341-346.

- PAMPIGLIONE, S., RIVASI, F., CRISCUOLO, M., DE BENEDITTIS, A., GENTILE, A., RUSSO, S., TESTINI, M., Y VILLANI, M. Human Anisakiasis in Italy: A report of eleven New Cases. *Pathology*, 2002, vol. 198, N° 6, p 429-434.

- ROMERO, MDC., VALERO, A., NAVARRO, MC., HIERRO, I., BARÓN, S., Y MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Experimental demonstration of pathogenic potential of *Anisakis physeteris* and *Anisakis paggiae* in Wistar rats. *Parasitology Research*, 2014, vol. 113, N° 12, p 4377-4386.
- SÁNCHEZ MARIN, AITANA. “Introducción a la experimentación con animales”. Asesor: Carmen Torres Bares. Tesis Título Profesional. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de Jaén, España, 2015.
- SHIMAMURA, Y., MUWANWELLA, N., CHANDRAN, C., KANDEL, G., Y MARCON., N. Common Symptoms from an Uncommon Infection: Gastrointestinal Anisakiasis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2016, vol. 4, p1-7.
- SHWEIKI, E., RITTENHOUSE, D., OCHOA, J., PUNJA, V., ZUBAIR, M., Y BALIFF J. Acute small- bowel obstruction from intestinal Anisakiasis after the ingestion of raw clams, documenting a new method of marine to human parasitic transmission. *BRIEF REPORT (OFID)*, 2014, vol. 1, N ° 2, p 1-5.
- TAKANO, Y., GOMI, K., ENDO, T., SUZUKI, R., HAYASHI, M., NAKANISHI, T., TATENO, A., YAMAMURA, E., ASONUMA, K., INO, S., KUROKI, Y., NAGAHAMA, M., INOUE, K Y TAKASHASHI, H. Case Report Small Intestinal Obstruction Caused by Anisakiasis. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2013, vol. 12, N ° 1, p 4.
- TORRENTE, S., MITXELENA A., ALBERDI A., Y ZUBELTUZU B. *Anisakis* como causa de ileitis y obstrucción intestinal. *RAPD ONLINE*, 2017, vol. 40, N°1, p 49-52.

X. ANEXOS

Anexo 1. Ciclo biológico de *Anisakis* spp.

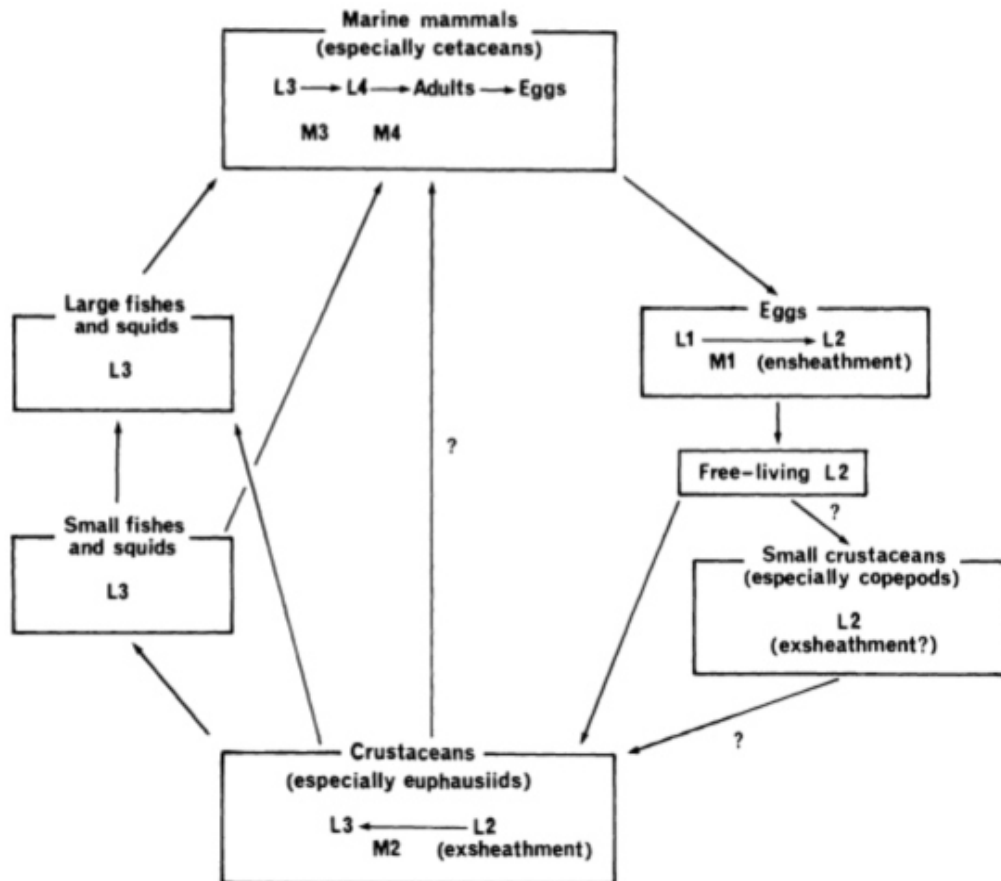
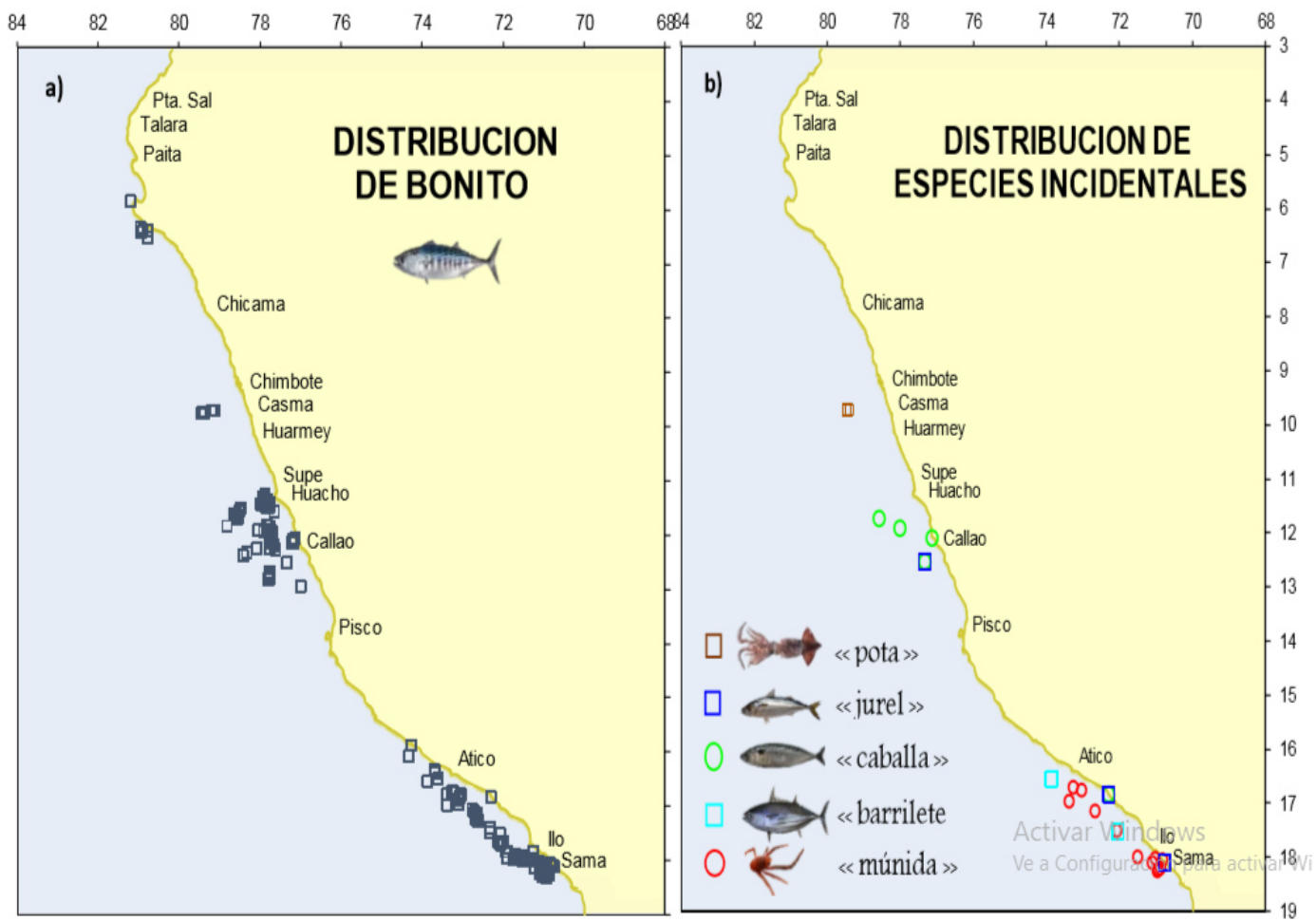


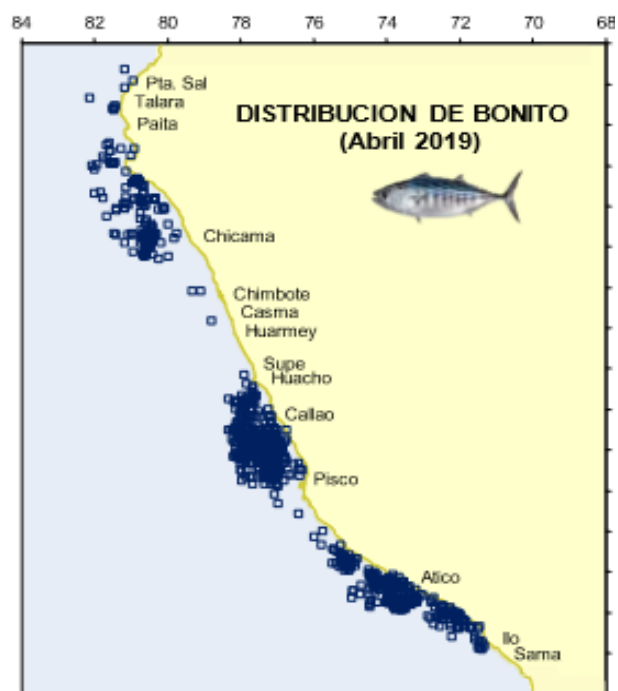
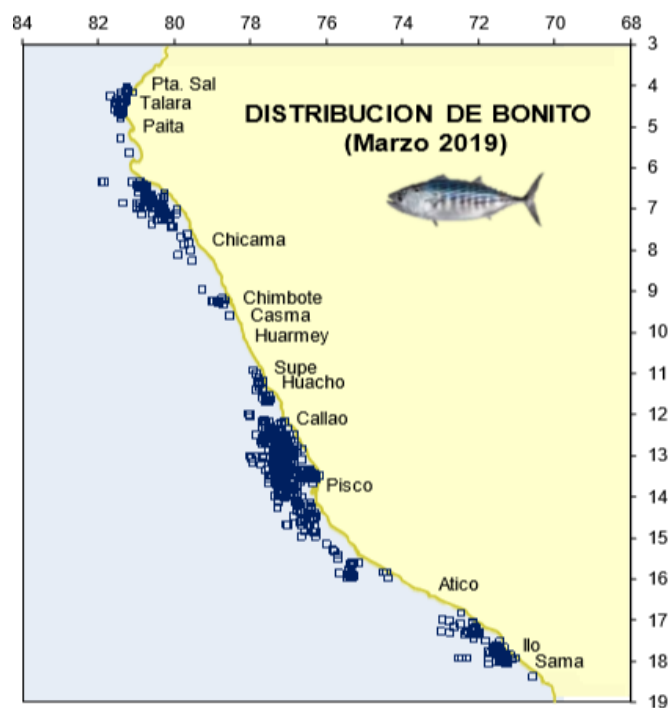
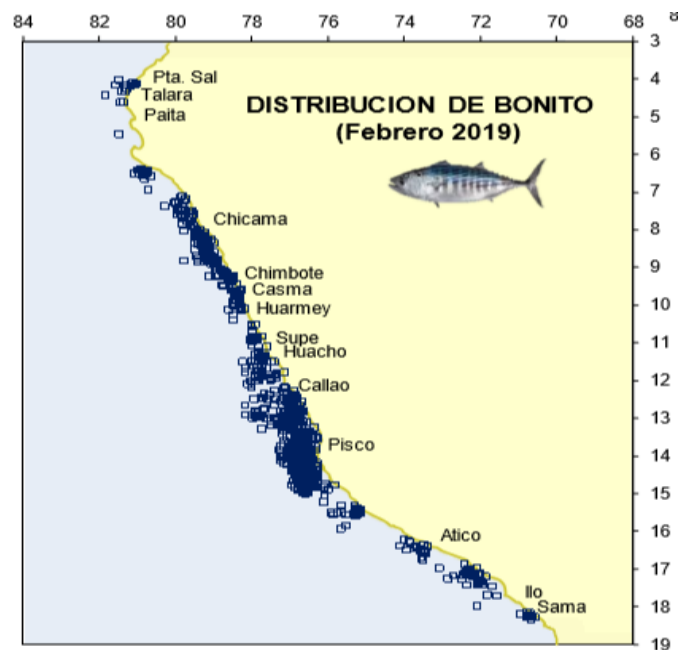
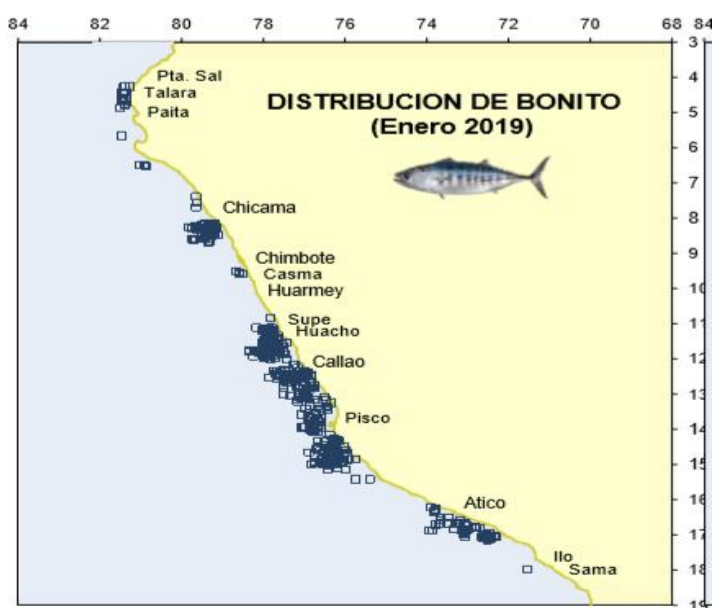
Figure 3.1. Life cycle of *Anisakis simplex* L1, L2, L3, L4 = first-stage, second-stage, third-stage, and fourth-stage larvae: M1, M2, M3, M4 = first, second, third, and fourth moults.

ISHIKURA, H, KIKUCHI, K., NAGASAWA, K., OIWA, T., TAKAMIYA, H., SATO, N., Y SUGANE, K. (1992). Anisakidae and anisakidosis. *Prog Clin Parasitol*, 3, pg 51.

Anexo 2. Distribución del bonito a lo largo del litoral peruano



Anexo 2.1. Distribución durante el 2018



Anexo 2.2. Distribución del bonito durante enero - abril del 2019

Anexo 3. Desembarque del bonito de Enero a Mayo del 2019

Desembarques de Bonito (*Sarda chilensis*) en toneladas por tipo de flota (01 Enero - 07 Mayo* 2019)

Mes/ Flota	Ind	Art	Capt Inc	Total
ENERO	0	2 376	9	2 385
FEBRERO	0	4 596	24	4 620
MARZO	0	2 675	141	2 816
ABRIL	0	4 708	0	4 708
MAYO*	0	1 619	0	1 619
TOTAL	0	15 974	174	16 148

Balance del Límite de Captura de Bonito 2019

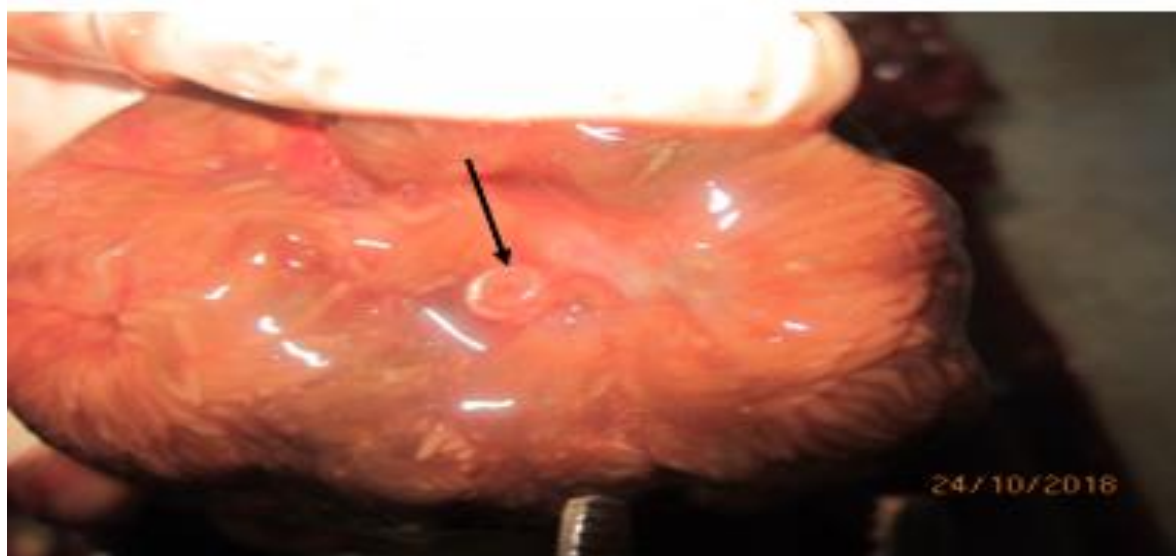
R.M. 003-2019-PRODUCE	Límite Captura Bonito = 64 mil t	
Límite de Captura de Bonito	Tonelada:	%
Lím. Captura Bonito (01 Ene - 31 Dic 2019)	64 000	
Total Bonito al 07 Mayo*	16 148	25.23
Remanente	47 852	74.77

Anexo 4. Resumen de talla y peso de peces evaluados

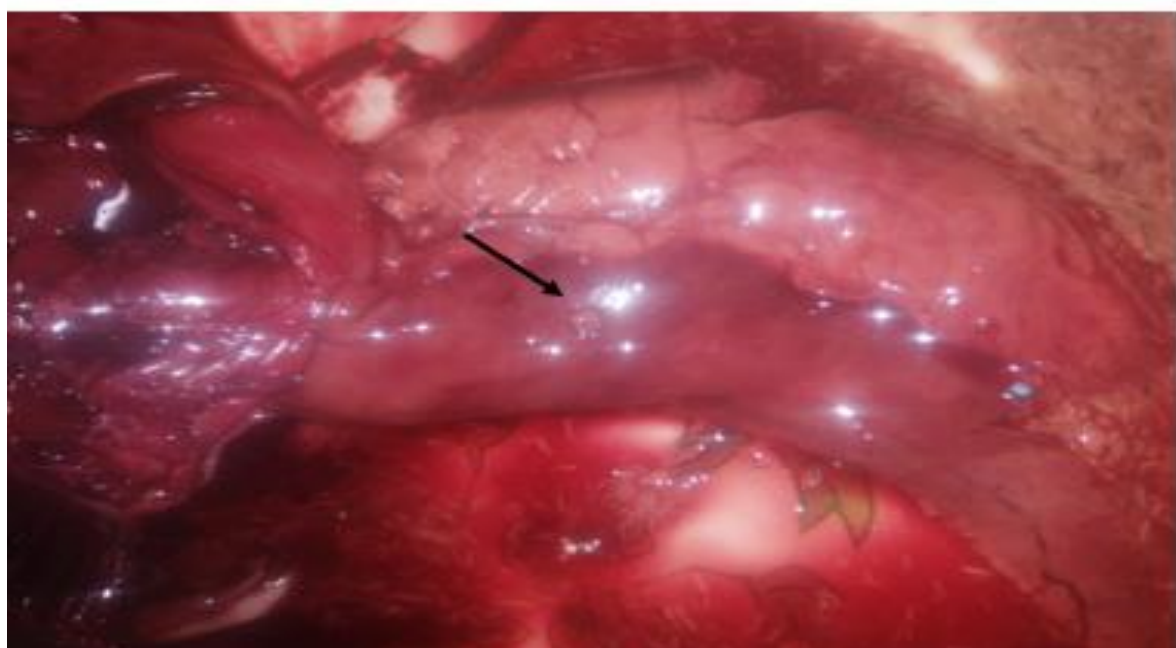
Tabla A4. Peso y longitud total de los 787 especímenes de *S. chiliensis chiliensis* examinados

	Peso (Kg)	Longitud (cm)
<i>S. chiliensis chiliensis</i>	2.3 - 3.8 (3.1)	52.3 - 60.5 (58.6)

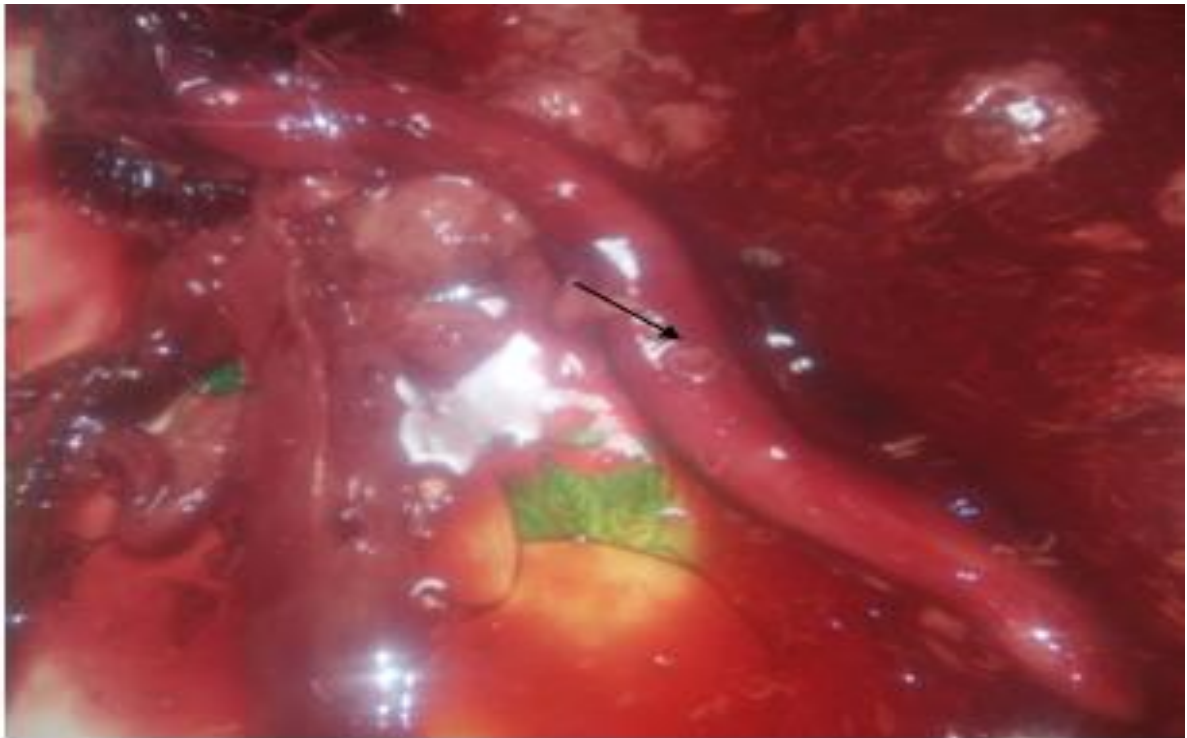
Anexo 5. Larvas tipo II de *Anisakis* spp. enquistadas en diferentes organos del Bonito.



Anexo 5.1. Larva enquistada en el ciego



Anexo 5.2. Larva enquistada en el hígado



Anexo 5.3. Larva enquistada en superficie del estomago



Anexo 5.4. Larva enquistada en el bazo

Anexo 6. Larva morfotipo II de *Anisakis* spp.

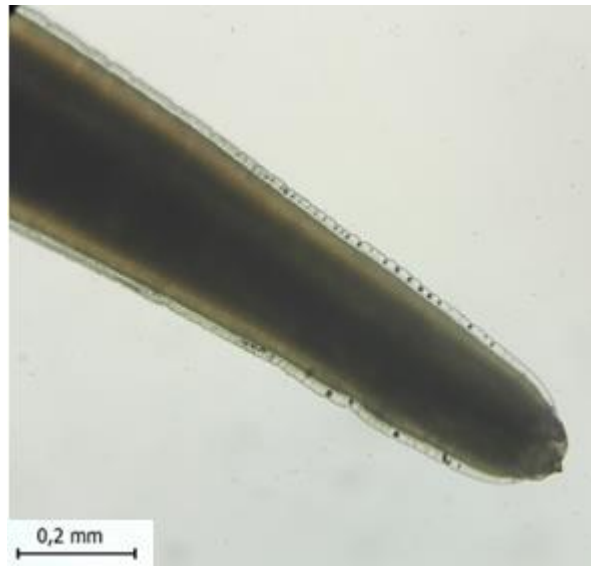


Fig. A6.1. Extremo anterior de la *Anisakis* spp. morfotipo II donde se muestra el diente (magnificación x 10).

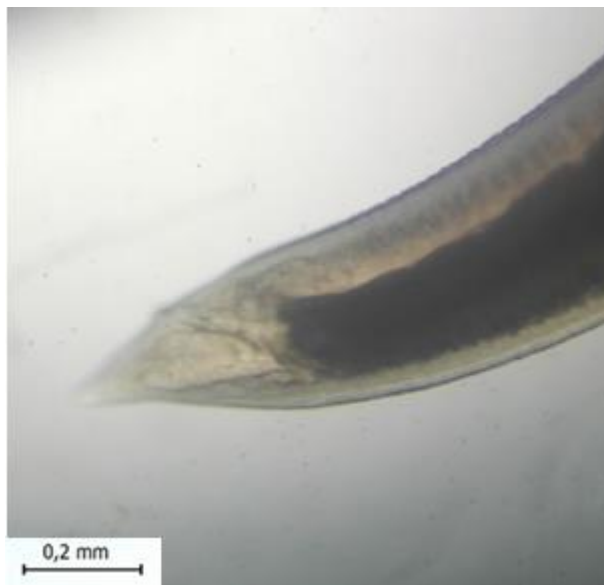


Fig. A6.2. Extremo posterior de *Anisakis* spp. morfotipo II termina en punta sin micrón (magnificación x 10).

Anexo 7. Estadística

Para aplicar ANOVA tiene que comprobarse la normalidad y elasticidad de los datos.

Normalidad (Grafica A6.1)

Esta se comprobó usando la prueba de Kolmogórov-Smirnov, que considera los datos con distribución normal cuando el resultado es $p > 0.05$ (Fig.)

Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): los datos presentan una distribución normal

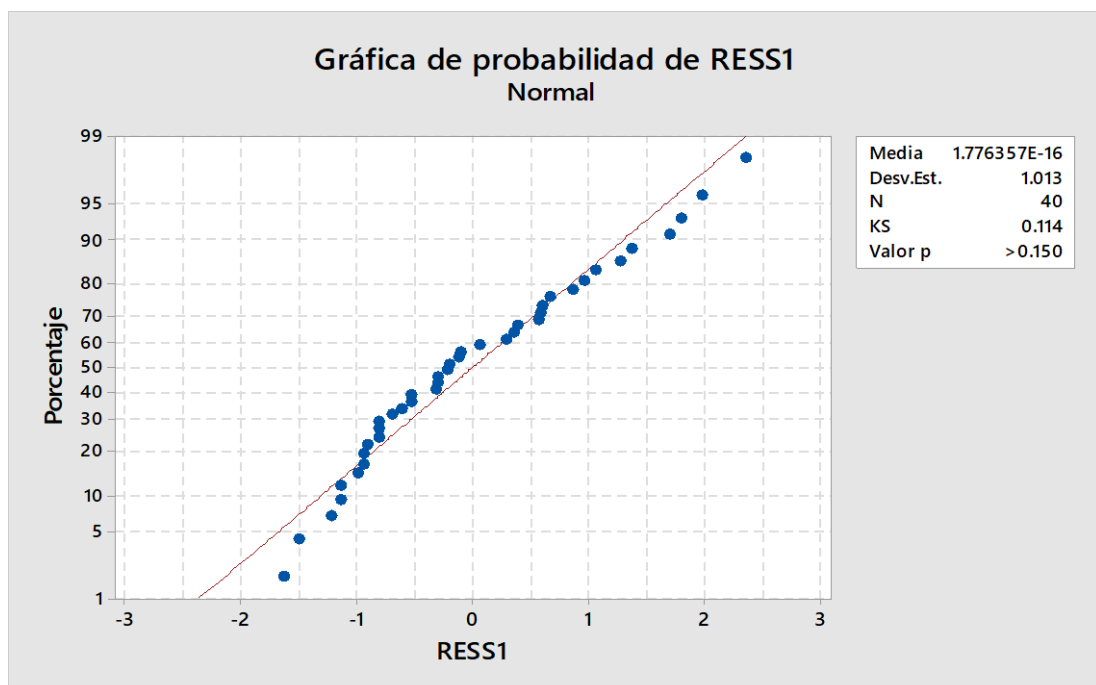
Hipótesis alterna (H_i): los datos no presentan comportamiento normal

Nivel de
significancia $\alpha = 0.05$

Si $p > 0.05$ no se rechaza H_0 , si $p < 0.05$ se rechaza la H_0

Decisión

No se rechaza la H_0 ($p > 0.150 > 0.05$) por lo tanto presenta una distribución normal



Grafica A6.1. Q-Q plot normal

Homocedasticidad (Grafica A6.2)

La igualdad de varianzas se comprobó usando la prueba de Levene, que considera los datos con homogeneidad de varianzas cuando el resultado es $p > 0.05$

Hipótesis

Hipótesis nula : Todas las varianzas son iguales
 Hipótesis alterna : Por lo menos una varianza es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Decisión

No se rechaza la hipótesis nula ($P = 0.995 > 0.05$) por lo tanto cumple la homogeneidad de varianzas.

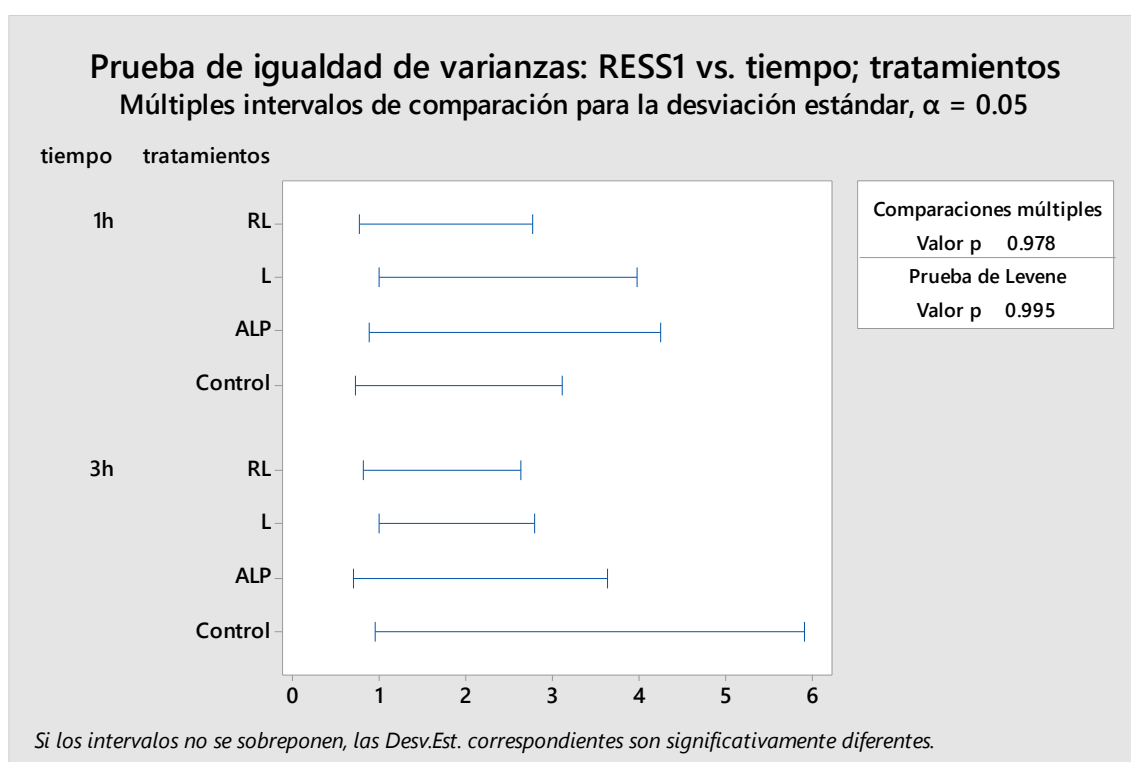


Gráfico A6. 2. Comparación de intervalos para determinar la homocedasticidad

RL: Larvas patógenas pre tratadas con *C. pubescens*, *C. limon* antes de infección.

L: Larvas patógenas pre tratadas con *C. limon* antes de infección.

ALP: Larvas patógenas pre tratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* antes de infección.

Control: Larvas patógenas sin pre tratamiento con ninguna especie anterior antes de infección.

Análisis de varianza (Tabla 4)

Factor tratamiento de las larvas L3

Hipótesis

Ho: No existe diferencia entre los distintos tratamientos incluido el control con respecto al N° de larvas que muestran potencial patógeno sobre el N° de larvas administradas en el modelo murino

Ha: Si existe diferencia entre los distintos tratamientos incluido el control con respecto al N° de larvas que atraviesan la pared gastrointestinal sobre el N° de larvas administradas en el modelo murino

Con una significancia del 5% existe evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula ($p = 0.001 < 0.05$) y concluir con nivel de confianza del 95% que este es un factor definitivo para generar variantes en el N° de larvas que muestran potencial patógeno sobre el total de N° de larvas inoculadas.

Factor tiempo de tratamiento de larvas L3

Hipótesis

Ho: El tiempo de exposición en los distintos tratamientos no influye con relación al N° de larvas que presentaba potencial patógeno sobre el número de larvas administradas en el modelo murino

Ha: El tiempo de exposición en los distintos tratamientos si influye con relación al N° de larvas que presentaba potencial patógeno sobre el número de larvas administradas en el modelo murino.

Con una significancia del 5%, no hay evidencia estadística suficiente para que se rechace la hipótesis nula ($p = 0.054 > 0.05$) y se concluye que no resulta significativo el hecho de que se les expongan 1 hora o 3 horas. Por consiguiente, cualquier tiempo de exposición de las larvas en cada tratamiento no afecta sobre nuestra variable respuesta.

Interacción de ambos factores

Hipótesis

Ho: La interacción del tiempo de exposición con los tratamientos no influye sobre la variable respuesta.

Ha: La interacción del tiempo de exposición con los tratamientos si influye sobre la variable respuesta.

Con una significancia del 5%, no existe evidencia estadística capaz de rechazar la hipótesis nula ($p = 0.294 > 0.05$) y se concluye que la interacción de estos dos factores no influye sobre el número de larvas que manifiestan tener potencial patógeno respecto al N° total de larvas inoculadas.

Prueba de Tukey

Tabla A6.1 Información agrupada utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tratamientos	N	Media	Agrupación
Control	10	0.3430	A
L	10	0.1770	B
ALP	10	0.1660	B
RL	10	0.1280	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

RL: Larvas patógenas pre tratadas con *C. pubescens*, *C. limon* antes de infección.

L: Larvas patógenas pre tratadas con *C. limon* antes de infección.

ALP: Larvas patógenas pre tratadas con *A. sativum*, *C. limon* y *P. nigrum* antes de infección.

Control: Larvas patógenas sin pre tratamiento con ninguna especie anterior antes de infección.

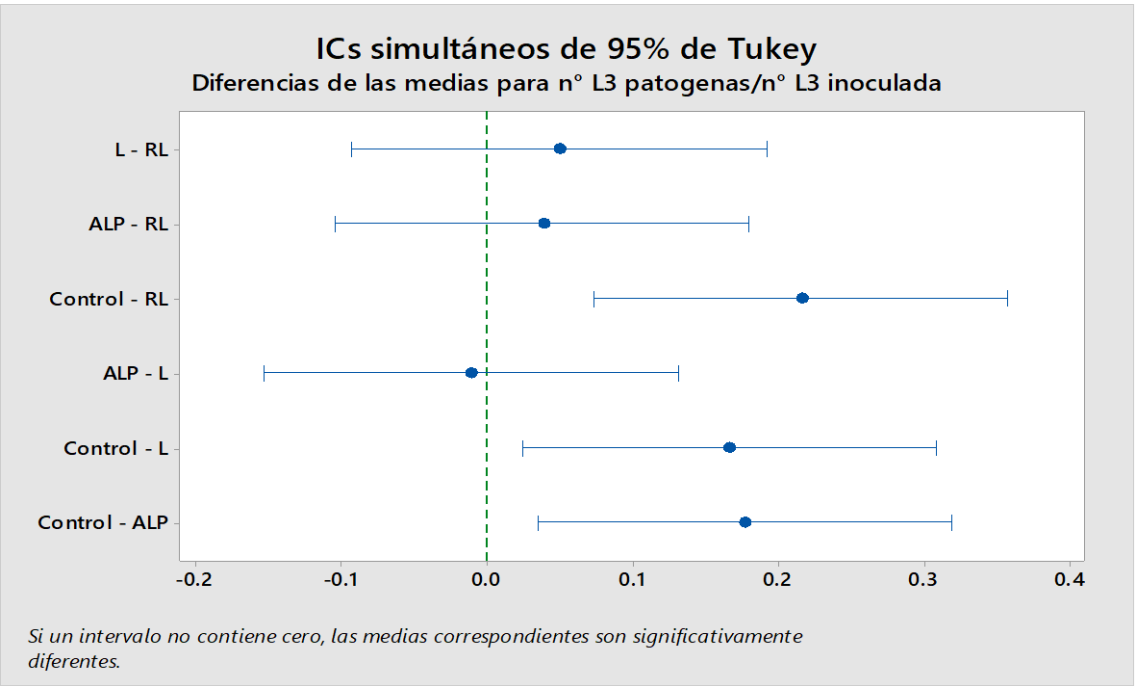
Tabla A6.2. Medias de la variable respuesta de cada grupo experimental

tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
RL	10	0.1280	0.0940	(0.0523; 0.2037)
L	10	0.1770	0.1283	(0.1013; 0.2527)
ALP	10	0.1660	0.1265	(0.0903; 0.2417)
Control	10	0.3430	0.1202	(0.2673; 0.4187)

Desv.Est. agrupada = 0.118065

Las medias de la variable respuesta que no comparte una letra son significativamente diferentes como se observa en el grupo control en relación con los otros tratamientos.

Los tres tratamientos (L, ALP y RL) dieron un efecto similar respecto ya que comparten la misma letra (Tabla A6.2) y por tanto sus medias son muy parecidas no existiendo diferencia significativa entre en N° de larvas con potencial patógeno respecto del número de larvas administradas; sin embargo, comparado con el control en cada tratamiento, existe una diferencia significativa ya que no comparten ni una letra y sus medias son muy diferentes.



Grafica A6.3. Comparación en parejas aplicando método de Tukey.

Anexo 8. Sala de muestreo de peces pelágicos y demersales de Imarpe.



Anexo 9. Equipos de Laboratorio de Patobiología acuática de Imarpe utilizado para procesamiento histológico.

